

CAROLINA RODRIGUES LINCOLN DE CARVALHO

**TÉCNICA DE *MLPA*: UMA ALTERNATIVA PARA A
INVESTIGAÇÃO DE REARRANJOS
SUBTELOMÉRICOS EM INDIVÍDUOS COM ATRASO
DO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR OU
DEFICIÊNCIA MENTAL IDIOPÁTICA.**

Implantação do Método no Departamento de Genética Médica da
FCM-UNICAMP.

Campinas

2009

CAROLINA RODRIGUES LINCOLN DE CARVALHO

**TÉCNICA DE *MLPA*: UMA ALTERNATIVA PARA A
INVESTIGAÇÃO DE REARRANJOS
SUBTELOMÉRICOS EM INDIVÍDUOS COM ATRASO
DO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR OU
DEFICIÊNCIA MENTAL IDIOPÁTICA.**

Implantação do Método no Departamento de Genética Médica da
FCM-UNICAMP.

Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antonia Paula Marques de Faria.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maricilda Palandi de Mello.

Campinas
Unicamp
2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L638t Lincoln-de-Carvalho, Carolina Rodrigues
Técnica de MLPA: uma alternativa para a investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática / Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Antonia Paula Marques-de-Faria, Maricilda Palandi De Mello

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Deficiência mental. I. Marques-de-Faria, Antonia Paula . II. De Mello, Maricilda Palandi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : The MLPA technique : an alternative for subtelomeric rearrangements investigation in developmental delay or idiopathic mental retardation

Keywords: • Mental disability persons

Titulação: Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Antonia Paula Marques-de-Faria

Profa. Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez

Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato

Data da defesa: 20-05-2009

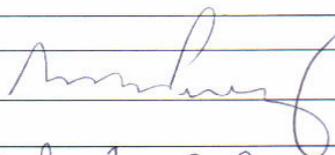
Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho

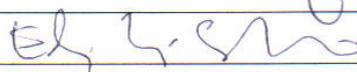
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Antonia Paula Marques De Faria

Membros:

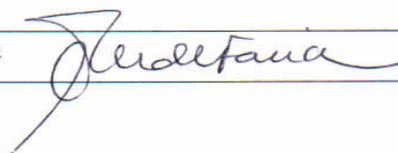
Professor (a) Doutor (a) Ana Beatriz Alvarez Perez



Professor (a) Doutor (a) Edi Lúcia Sartorato



Professor (a) Doutor (a) Antonia Paula Marques De Faria



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/05/2009

*Aos meus pais, Márcia e Marcel e meu irmão Lucas,
Devo a vocês tudo o que sou hoje. Vocês são minha fortaleza, meu porto seguro e
meu exemplo de vida. Dedico a vocês mais essa vitória, pois dela vocês têm
grande participação.*

*Ao meu noivo Pedro,
Nossa caminhada juntos ainda é longa. Espero que ela seja tão feliz e próspera
como tem sido durante esses anos em que estamos juntos. Obrigada por me fazer
a pessoa mais feliz do mundo. Amo você.*

*Meus irmãozinhos de pena, Nino, Kika, Luck e Juvenal,
Com o carinho gratuito e sincero que vocês têm por mim, acredito que o mundo
possa ser melhor a cada amanhecer.*

Esse trabalho resume bem a máxima de que sozinho não fazemos nada. Por isso registro aqui meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção e realização desse.

Primeiramente agradeço a Deus por guiar-me sempre pelos melhores caminhos, com saúde, sabedoria, paciência e força para enfrentar os desafios diários.

Aos meus pais Márcia e Marcel, irmão Lucas e noivo Pedro por tudo que fizeram e fazem por mim. Pela base sólida que tenho como família. Juntos somos um só, por isso essa vitória compartilho com vocês. Amo-os incondicionalmente.

Minhas avós Marina e Odete por ser um exemplo em minha vida... Obrigada pelas orações!

Meus padrinhos Neide e Mauri por me apoiarem e torcerem pelo meu sucesso.

Meus padrinhos Francisca e João por me amarem e sempre me recepcionarem de braços abertos em seu lar; em suas vidas.

Minha tia Marilene Bargas Rodrigues Alves pelo apoio como amiga, tia e profissional bióloga geneticista.

Meus tios, primos, sogros e cunhados queridos que torcem por mim desde a minha saída de casa, em 2001, para uma cidade desconhecida, com o objetivo de estudar e ser uma profissional melhor capacitada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Antonia Paula Marques de Faria pela oportunidade de crescimento profissional, pessoal e pela sua orientação.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Maricilda Palandi de Mello pela amizade, ajuda técnica e por ter me acolhido no CBMEG.

À banca examinadora de exame de qualificação e defesa de dissertação Prof^{es}. Dr^{es}. Ana Beatriz Alvarez Perez, Andréa Trevas Maciel Guerra, Carlos Eduardo Steiner, Cláudia Vianna Maurer Morelli, Edi Lucia Sartorato e Victor Evangelista de Faria Ferraz pela contribuição na elaboração da minha dissertação de mestrado.

Ao colega Guilherme Martins pela presteza em ajudar e sua eficiência com o equipamento ABI 310, sem o qual esse projeto não teria sido concluído.

À Dr^a. Fernanda Jehee pela receptividade em seu laboratório e pelo aprendizado com a técnica de MLPA.

Às Dr^{as}. Mônica Melo e Biól. Clarisa pelos ensinamentos com o ABI 310.

À Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Gil da Silva Lopes pela receptividade quando cheguei à Unicamp, pela sua amizade e gentileza em permitir a execução dos testes de FISH no Laboratório de Citogenética Humana FCM-UNICAMP.

À Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Bertuzzo pelo aprendizado e companheirismo desde a época como aprimoranda do curso de Genética Molecular e Citogenética Humana FCM-UNICAMP.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares pela participação nesse estudo.

Aos colegas do Departamento de Genética Médica: Anderson, Aline (Lilika), Bibiana (Bibi), Cintia Marques (Cin), Cyntia Correia (Cyn), Daniela Furgeri, Daniela Sousa (Danizinha), Fábio Conti, Lillian (Lilli), Lidiane (Lidy), Luciana (Lú), Lucila, Marcelo, Marilza, Marjory (Jory), Marina, Nilma, Pâmela (Pâm), Renato (Zé Bola), Rodrigo, Romênia (Rô), Simone (Si) e Tatyane (Taty) pela grata amizade desde a época de aprimoranda, pelas experiências trocadas, pelo apoio e torcida.

Ao Fábio Rossi pela atenção dispensada com a leitura da tese e pelas sugestões.

À Teresa Vieira Chiodetto pela amizade, preocupação e por me acolher tão bem em seu coração, permitindo que eu a considere sua “mãe Campineira”.

Aos residentes Carolina Moreno, Fabíola Monteiro, Fabíola Vicente, Joana Prota e Maurício Sakata pela amizade, almoços alegres, pela torcida e auxílio com os pacientes.

Aos colegas do CBMEG: Ana Letícia (Len), Bruna, Carolzinha, Carol (Pr), Carol (Xuxa), Daiane (Dai), Denise (Dê), Débora (Dé), Diego, Émerson (Creyto), Fer Soardi (II), Flávia (Flor), Francine (Fran), Juliana (Jú), Mara (Marinha), Milena (Mi), Nathália (Nati), Paulo (Blade), Regiane (Rê), Renan, Reginaldo (Rêgi, Rêgi...), Riccardo, Rose, Suely (Su), Vanessa (Van), Vânia e Zélo pela recepção ao novo laboratório, pela amizade conquistada e pelo convívio agradável.

À Fernanda Coeli pela ajuda e cumplicidade frente ao “elefantinho branco” ABI 310.

*Às secretárias do Departamento de Genética Médica, Cláudia e Sueli, pela gentileza e pelos momentos de descontração durante a revisão dos prontuários.
À Rafaela pela eterna disposição em me ajudar, sempre com sorriso estampado no rosto!*

À secretária da pós-graduação, Marcinha, por sua eficiência, ajuda em diversos momentos e amizade.

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia e Andrezza, pela presteza em me auxiliar.

Às responsáveis pela limpeza sem as quais não seria possível trabalhar no laboratório.

À todos os professores que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

E não menos importante...

Minhas amigas Carla Polaz, Karen Polaz, Marina Mello e Milena Paschoal por sempre acreditarem em mim e me apoiarem (mesmo a distância). Com vocês descobri que a amizade é capaz de ultrapassar barreiras geográficas e do tempo.

Minha amiga Laisa di Salvio pelo seu exemplo de força, coragem e determinação para conseguir seus objetivos. Te agradeço pelo incentivo em todos os momentos e por me ensinar que a amizade verdadeira se renova todos os dias, independente da distância.

Meus amigos Bernardo, Erika (Su), Ilária e Társis pela amizade, pela ajuda, por me escutar, me fazer rir mesmo quando a piada ou situação não era engraçada, pelas viagens, congressos, saídas, baladinhas e jantares.

Minha amiga Karina Cunha pela amizade “repentina”, sua cumplicidade instantânea, pelo companheirismo em dividir um apartamento comigo, pelos jantares (principalmente cachorro quente!), pelas intermináveis conversas, risadas (muitas!), pela ajuda em escrever/ler emails, tese, relatórios...

Minha amiga Milena Simioni: uma pessoa como poucas, que deveria ser seguida por muitas... Suas qualidades, como bondade, amor ao próximo, competência e sensibilidade as fazem ser uma pessoa maravilhosa. Obrigada por tudo que fez e faz por mim!

Obrigada!

“Veni, vidi, vici”

“Vim, vi, venci”

Júlio César, 45 a.C.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xxv
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xli
1. INTRODUÇÃO	45
1.1. Considerações gerais sobre deficiência mental	45
1.2. Fatores Etiológicos da DM	47
1.2.1. Fatores Ambientais	47
1.2.2. Fatores genéticos	48
1.3. Rearranjos subteloméricos em DM idiopática	50
1.4. Investigação de rearranjos subteloméricos em DM idiopática	53
1.4.1. A técnica de FISH	56
1.4.2. A técnica de <i>array</i> -CGH	58
1.4.3. A técnica de MAPH	60
1.4.4. A técnica de MLPA	62
2. JUSTIFICATIVA	73
3. OBJETIVOS	77
3.1. Objetivos Gerais	77
3.2. Objetivos Específicos	77
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	81
4.1. Padronização da técnica de MLPA	81
4.1.1. Amostra inicial	81
4.1.2. Técnica de MLPA	81
4.1.2.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas	84
4.1.2.2. Reação de ligação	84
4.1.2.3. Reação de PCR	84
4.1.2.4. Separação e visualização dos produtos de amplificação	85
4.1.2.5. Análise dos dados	85
4.2. Seleção dos pacientes para análise	86
4.2.1. Coleta do material	87
4.2.2. Triagem por MLPA	89
4.3. Confirmação dos casos alterados	90
4.4. Validação dos resultados	92
4.4.1. Validação pela técnica de seqüenciamento	92
4.4.2. Validação pela técnica de FISH	95
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1. Calibração do equipamento ABI-PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied, Biosystems – Applied Corporation, Estados Unidos)	99
	xvii

5.2. Padronização da técnica de MLPA - <i>kit</i> P036-D2 e <i>kit</i> P036-E1 HUMAN TELOMERE-3	103
5.2.1. Validação da técnica utilizando controles negativos e com alteração	103
5.2.2. Tempo de estocagem dos produtos de reação em refrigerador	121
5.2.3. Possibilidade de diminuição do protocolo, para 1/2 ou 2/3 do recomendado pelo fabricante	125
5.2.4. Quantidade de DNA utilizado na reação	129
5.2.5. Plataforma de análise	133
5.2.6. Elaboração de um protocolo detalhado, com todos os passos da técnica, já ajustada à infra-estrutura da instituição	136
5.3. Estudo envolvendo pacientes com DM idiopática atendidos no Departamento de Genética Médica FCM-Unicamp	136
5.3.1. Casos com resultado indicativo (ou sugestivo) de rearranjo subtelomérico	139
5.3.1.1. Alteração del(12p)	139
5.3.1.2. Alteração del(1p36)	147
5.3.1.3. Alteração del(5p)/dup(9p) associada a síndrome de <i>cri-du-chat</i>	155
5.4. Discussão da viabilidade do método como triagem para a detecção de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática	166
6. CONCLUSÕES	171
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
8. ANEXOS	193
8.1. ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	193
8.2. ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	195
8.3. ANEXO 3: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES AVALIADOS	198
8.4. ANEXO 4: PROTOCOLO ADAPTADO PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MLPA	209

LISTA DE ABREVIATURAS

APA	<i>American Psychiatric Association</i>
array-CGH	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridização Genômica Comparativa baseada em plataforma <i>array</i>)
array-MAPH	<i>Array Multiplex Amplification and Probe Hybridization</i> (Amplificação Múltipla de Sondas Hibridizadas baseada em plataforma <i>array</i>)
BRCA1	gene <i>Breast Cancer 1</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CCDC127	gene <i>Coiled-Coil Domain Containing 127</i>
CCM1	gene <i>Cerebral Cavernous Malformations 1</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridização Genômica Comparativa)
DD	Fragmentos de controle de Desnaturação de DNA (MLPA)
del	deleção
DGM	Departamento de Genética Médica
DM	Deficiência Mental
DMD	<i>Duchenne Muscular Dystrophy</i> (Distrofia Muscular de Duchenne)
DMRT1	gene <i>Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)
DOCK8	gene <i>Dedicator of Cytokinesis 8</i>
DQ	Fragmentos de controle de Quantidade de DNA (MLPA)
dup	duplicação
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (Hibridização <i>In Situ</i> com Fluorescência)
FMR1	gene <i>Fragile-X Mental Retardation 1</i>
FMRP	<i>Fragile-X Mental Retardation Protein</i>
GABRD	gene <i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Delta</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JARID1A	gene <i>Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1A</i>
Kb	kilobases
KCNAB2	gene <i>Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-Related Subfamily, Beta Member 2</i>
MAPH	<i>Multiplex Amplification and Probe Hybridization</i> (Amplificação Múltipla de Sondas Hibridizadas)

MLH1	gene <i>MutL Homolog 1, Colon Cancer, Nonpolyposis Type 2</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification</i> (Amplificação de sondas Dependente de Ligação)
MMP23B	gene <i>Matrix Metalloproteinase 23B</i>
MSH2	gene <i>MutS Homolog 2, Colon Cancer, Nonpolyposis Type 1</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
np	braço curto do cromossomo <i>n</i>
nq	braço longo do cromossomo <i>n</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PDCD6	gene <i>Programmed Cell Death 6</i>
PRINS	<i>primed in situ labeling</i>
QI	Quociente Intelectual
QMPSF	<i>Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments</i> (PCR Multiplex Quantitativo de fragmentos pequenos e fluorescentes)
RDNPM	Retardo do desenvolvimento neuromotor
SCDC	Síndrome do <i>cri-du-chat</i>
SLC6A12	gene <i>Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Betaine/GABA), Member 12</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo simples)
SNRPN	gene <i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N</i>
SSC	Solução Salina Citrato
SXF	Síndrome do X-Frágil
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i> (Tris/Borato/EDTA)
TE	Tris-EDTA
tm	<i>Temperature of melting</i> (temperatura de anelamento)
TNFRSF4	gene <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4</i>
TNFRSF18	gene <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 18</i>
TSC1	gene <i>Tuberous Sclerosis 1</i>
TSC2	gene <i>Tuberous Sclerosis 2</i>
UBE3A	gene <i>Ubiquitin Protein Ligase E3A</i>
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeats</i> (número variável de repetições em <i>tandem</i>)
6-FAM	6-carboxifluorescina (C ₂₁ H ₁₂ O ₇)
µL	microlitros

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Organização das regiões teloméricas e subteloméricas dos cromossomos	55
Figura 2	Constituição dos oligonucleotídeos das sondas de MLPA.	63
Figura 3	Anelamento dos oligonucleotídeos na sequência de DNA genômico e posterior união desses oligonucleotídeos pela enzima ligase dependente de temperatura.	63
Figura 4	Fragmento único resultado da reação de ligação, Intermediada pela enzima ligase dependente de temperatura, e sua disposição, quanto as partes que a compõem.	63
Figura 5	Resultado da amplificação dos produtos de ligação através de PCR, com a utilização de <i>primers</i> universais.	64
Figura 6	Exemplo de separação e quantificação por eletroforese capilar.	64
Figura 7	Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos.	85
Figura 8	Ciclos utilizados na amplificação da região de interesse do gene <i>SLC6A12</i> .	93
Figura 9	Ciclos utilizados nas reações de sequenciamento automático.	94
Figura 10	Emissão espectral dos cinco tipos de fluorescência utilizados no equipamento de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310.	100
Figura 11	Exemplo de teste ccd-4 cores rejeitado, mostrando os padrões 6-FAM e ROX interferindo um em outro, obtido durante a construção da matriz de genotipagem para o equipamento ABI-PRISM® 310.	102
Figura 12	Exemplo de teste ccd-4 cores aceito, após a limpeza do capilar, ilustrando a segregação paralela dos padrões, sem interferência de um em outro.	102
Figura 13	Possíveis diferenças encontradas quando se trabalha com parâmetros de área, para leitura de amplificação de sondas com tamanhos grandes.	106
Figura 14	Gráfico de uma reação-controle no primeiro experimento (Ca) e no experimento de confirmação (Cb), da primeira etapa de padronização, segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems - Applied Biosystems Corporation, Estados Unidos</i>).	109
Figura 15	Gráfico de uma reação-controle no primeiro experimento (Ca) e no experimento de confirmação (Cb), da primeira etapa de padronização, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.	109

Figura 26	Gráfico de reação-controle com 150 ng de DNA (R), com 500 ng de DNA (B) e com 50 ng de DNA (A), segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos</i>).	131
Figura 27	Gráfico de reação-controle com 150 ng de DNA (R), com 500 ng de DNA (B) e com 50 ng de DNA (A), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.	131
Figura 28	Gráfico de reação para os indivíduos sem alteração (P) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o <i>kit</i> SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos</i>).	137
Figura 29	Gráfico do resultado de MLPA para os indivíduos sem alteração (P) em comparação ao controle normal (C) para o <i>kit</i> SALSA MLPA P036, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.	137
Figura 30	Localização dos genes <i>SLC6A12</i> e <i>JARID1A</i> (cromossomo 12p), cujas sequências foram utilizadas para a confecção das sondas 12p presentes nos <i>kits</i> SALSA MLPA P036 e P070, respectivamente.	140
Figura 31	Gráfico de reação para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o <i>kit</i> SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos</i>).	141
Figura 32	Gráfico do resultado de MLPA com o <i>kit</i> SALSA MLPA P036 para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61), em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.	141
Figura 33	Gráfico de reação para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o <i>kit</i> SALSA MLPA P070, segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos</i>).	143
Figura 34	Gráfico do resultado de MLPA com o <i>kit</i> SALSA MLPA P070 para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61), em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.	143
Figura 35	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do fragmento <i>SLC6A12</i> nos indivíduos P56, P61, P59 e P53. M: marcador de peso molecular 1 Kb.	145

Figura 46	Gráfico do resultado de MLPA com o <i>kit</i> SALSA MLPA P036 para o caso P64, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL–MANCHESTER.	159
Figura 47	Gráfico de reação do caso P64 em comparação a reação controle sem alteração (C) para o <i>kit</i> SALSA MLPA P070, segundo o programa Genotyper® (<i>Applied Biosystems – Applied Biosystems Corporation</i> , Estados Unidos).	161
Figura 48	Gráfico do resultado de MLPA com o <i>kit</i> SALSA MLPA P070 para o caso P64, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P070 DQ adaptive, do grupo NGRL–MANCHESTER.	161
Figura 49	Resultado de FISH para o paciente P64 com sonda subtelomérica para a região 5p e 9p mostrando apenas um sinal 5pter (verde) e três sinais 9pter (vermelho) (setas). Tal achado corrobora o resultado anômalo encontrado pela técnica de MLPA.	165

TABELAS

Tabela I	Causas de deficiência mental.	47
Tabela II	Revisão de estudos envolvendo triagem de indivíduos com DM relacionados a rearranjos subteloméricos.	50
Tabela III	SALSA MLPA P036-D2 HUMAN TELOMERE-3.	82
Tabela IV	SALSA MLPA P036-E1 HUMAN TELOMERE-3.	83
Tabela V	Critérios para seleção de pacientes com rearranjos teloméricos submicroscópicos.	87
Tabela VI	Reagentes participantes da preparação de soluções utilizadas na extração de DNA.	88
Tabela VII	SALSA MLPA P070-A2 HUMAN TELOMERE-5.	91
Tabela VIII	Sequência de <i>primers</i> para amplificação do gene <i>SLC6A12</i> .	92
Tabela IX	Características clínicas encontradas em pacientes com deleção terminal 1p36.	153
Tabela X	Comparação entre as características clínicas encontradas nos pacientes com del(5p), dup(9p), rearranjo del(5p)/dup(9p) (casos 1 e 2) e no paciente deste estudo.	163

RESUMO

A deficiência mental (DM) corresponde a uma das categorias mais amplas de distúrbios, acometendo de 1% a 3% da população nos países industrializados, enquanto nos países em desenvolvimento estima-se prevalência cerca de três vezes maior. Devido à heterogeneidade de fatores causais associados a essa condição, sua investigação diagnóstica pode ser complexa e 40% dos casos não têm sua origem determinada. Recentemente, foi demonstrado que rearranjos subteloméricos são responsáveis por 5% a 7% dos casos de DM idiopática. Entre as técnicas mais promissoras para a identificação dessas alterações, está a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), que possibilita a quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas. É baseada na hibridização do DNA genômico a uma mistura de sondas específicas para cada região estudada, com amplificação dos produtos de ligação pela técnica de PCR, utilizando um par de *primers* universal. A visualização dessas amplificações pode ser feita por eletroforese capilar e a análise por programas específicos de genotipagem. Entre as vantagens do método estão o custo relativamente baixo, simplicidade, rapidez e sensibilidade, justificando a implantação em serviços direcionados para o estudo da etiologia da DM. Assim, o propósito deste trabalho foi implantar o método em nosso laboratório, utilizando o *kit* SALSA MLPA P036 HUMAN TELOMERE para pesquisa de rearranjos subteloméricos em indivíduos com DM idiopática. Na padronização, foram empregados controles com e sem alteração subtelomérica, sendo avaliados os parâmetros de tempo de estocagem das reações em refrigerador; quantidade de DNA utilizado em cada reação; forma de normalização dos dados, e possibilidade de redução do volume das soluções empregadas para metade ou dois terços do preconizado no protocolo original, cujo volume final de reação é de 50 μ L, dos quais somente 0,75 μ L são utilizados na eletroforese capilar, com descarte do restante. A análise dos resultados, confirmados pela utilização de controles com e alterações subteloméricas, mostrou que a implantação do método foi bem-sucedida. Além disso, foi verificado que o tempo máximo de estocagem das reações em refrigerador sem prejuízo dos resultados é de aproximadamente três meses; que a quantidade de DNA satisfatória para o procedimento está entre 150-250 ng por reação; que não é aconselhável a utilização de protocolos com volumes reduzidos, pois a análise de reações realizadas dessa forma mostrou resultados falso-positivos quando comparados às reações feitas segundo o protocolo original; que a forma de normalização dos dados mais adequada para a análise dos resultados é a combinação dos programas GeneScan®, Genotyper® e planilha específica para cada *kit* ao invés do programa Coffalyser®, indicado pelo fabricante do produto. Após essa padronização, o método foi aplicado no estudo de 62 indivíduos com atraso do desenvolvimento ou DM de causa indeterminada, sendo identificadas alterações em seis deles. Duas foram constatadas também pelo *kit* de confirmação SALSA MLPA P070, sendo uma del(1p36) e outra um rearranjo del(5p)/dup(9p), ambas validadas pela análise por FISH. As quatro restantes [del(12p)] não foram observadas pelo *kit* de confirmação, sendo realizado sequenciamento automático que identificou o SNP (rs60220187). Concluindo, a técnica de MLPA foi implantada com sucesso, mostrando-se adequada e eficiente para a investigação de rearranjos subteloméricos.

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is the most frequent disability and affects 1% to 3% of general population in industrialized world, while in developing countries it is considered to be three times higher. The etiology is heterogeneous and includes multiple genetic and environmental factors, although in about 40% of the cases its cause remains undetermined. Recently, several studies suggest that chromosomal rearrangements involving subtelomeric regions are common causes of idiopathic MR and occur in approximately 5% to 7% of patients. The Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique has been proposed as one of the alternatives to identify these abnormalities. It is based on hybridization of genomic DNA to a mixture of standardized probes for each region studied. All of the probe ligation products are amplified by PCR using only one universal primer pair. Separation and visualization of the fragments can be developed and the analysis by means of specific softwares for genotyping. Relatively low cost, simplicity and sensitivity are among the advantages of this method, which has been considered as an alternative for diagnostic screening of individuals with undetermined MR or developmental delay. The present study aimed to implement this technique in our laboratory, using the SALSA MLPA P036 human telomere test kit for detecting subtelomeric rearrangements in idiopathic MR patients evaluated in our service. For validation study, eleven normal controls and two positive controls were utilized, as well as the following parameters were evaluated: period of storage of reaction, amount of DNA used for each reaction, procedures to data normalization and reduction of reaction volume. The validation was successful; in addition, it was verified that maximum period for storage of reaction was about three months; adequate amount of DNA for each reaction was approximately 150ng-250 ng; reduction in volume reaction produced false-positive results; the more suitable method for data normalization was a combination of GeneScan®, Genotyper® softwares and a the use of a specific Microsoft Excel® spreadsheet for each kit, instead of the Coffalyser® program, recommended by the manufacturer. After validation, a pilot study was carried out with 62 patients considered as idiopathic MR using initially the SALSA MLPA P036 kit. MLPA analyses have indicated abnormal copy number in six patients. SALSA MLPA P070 kit confirmed 2 out of the 6 alterations: a 1p36 deletion and a 5p deletion / 9p duplication rearrangement, which were validated by FISH analysis. Other four alterations corresponded to a same 12p deletion, which was not further confirmed. Sequencing the correspondent fragment a known as SNP rs60220187 was identified. In conclusion, we demonstrated that MLPA is an appropriate and efficient technique and should be considered as a routine screening in the evaluation of individuals with unexplained mental retardation or developmental delay.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre deficiência mental

A deficiência mental (DM) isolada ou associada a anomalias congênitas é um dos principais fatores de redução da qualidade de vida. Para o indivíduo e sua família, a DM representa limitação em diferentes graus, em geral determinando necessidade de supervisão, suporte e proteção permanente. Já para a população, pode ser considerado um problema de saúde pública tendo em vista sua prevalência alta e consequências negativas para a produtividade e as relações sociais, além do aumento na demanda por serviços médicos e educacionais especializados (1,2).

Trata-se de uma condição complexa, identificada pela redução substancial das funções intelectuais, concomitante a déficits no comportamento adaptativo, com limitações observadas em duas ou mais áreas como comunicação, cuidados pessoais, cotidiano, senso de direção, funções acadêmicas, trabalho, saúde e lazer (1,3,2).

Uma forma objetiva de classificação da DM baseia-se em testes psicométricos para determinação do quociente intelectual (QI), que têm sido alvo de críticas negativas, em parte pelo uso e interpretações inadequados. Atualmente, são vistos como um instrumento imperfeito, porém satisfatório, para avaliar os indivíduos com relação ao seu potencial de inteligência, sendo adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (4), que considera quatro níveis de gravidade com base no QI. Possuem DM leve os indivíduos com QI entre 50-70, DM moderada, aqueles cujo QI situa-se entre 35-49, DM grave, os com QI entre 20-34 e os indivíduos com QI inferior a 20 são considerados como tendo DM profunda. Entretanto, a maioria dos estudos considera dois grandes grupos, o da DM leve, que inclui indivíduos com QI entre 50 e 70, e DM grave, para aqueles cujo QI seja inferior a 50 (5,2). Como não há possibilidade de se aplicar e validar testes padronizados para determinação do QI antes de 5 anos de vida, para crianças nessa faixa etária que não atingirem os marcos do desenvolvimento

neuropsicomotor esperados para a idade, é utilizada a designação de atraso global do desenvolvimento, que pode incluir dificuldades no aprendizado e na adaptação, os quais por sua vez podem ser indicativos de déficit cognitivo ou intelectual no futuro (6).

A DM representa uma das categorias mais amplas de distúrbios, acometendo de 1% a 3% da população nos países industrializados, enquanto nos países em desenvolvimento estima-se que sua prevalência seja cerca de três vezes maior. Contribuem para este fato os efeitos de fatores ambientais adversos mais prevalentes nessas regiões, tais como desnutrição protéico-calórica, infecções do sistema nervoso central, além de carência de serviços de aconselhamento genético, idade materna avançada e maior frequência de casamentos consanguíneos (1,7,8,9,10,11,12).

No Brasil, segundo dados do Censo Demográfico de 2000, existem ao menos 24 milhões de pessoas com pelo menos uma forma de deficiência (mental ou física), representando, aproximadamente, 15% da população. Entre esses, em torno de 2,8 milhões (ou 1,6% da população residente) seriam deficientes mentais, dados esses provavelmente subestimados, porém suficientes para considera DM como um problema de saúde pública (13).

Com relação à gravidade, os casos de DM leve são a maioria, com frequência de sete a oito vezes maior do que as formas mais graves, sendo caracterizadas muitas vezes como atraso na fala, alteração do comportamento e/ou baixo rendimento escolar (9).

Um dos grandes desafios no âmbito da DM diz respeito à sua heterogeneidade causal, especialmente para os médicos geneticistas, pois 60% e 70% dos indivíduos encaminhados para avaliação em serviços de Genética Clínica apresentam algum grau de comprometimento intelectual. Entretanto, mesmo com o refinamento das técnicas de investigação diagnóstica, a proporção de casos que podem ser atribuídos a causas conhecidas oscila entre 30% e 65%, ou seja, aproximadamente 40% dos casos permanecem como de causa indeterminada (1,14,15).

Tabela I Causas de deficiência mental [adaptado de (1)].

Etiologia	%
Anormalidades cromossômicas	4 - 28
Síndromes dismórficas	3 - 7
Doenças monogênicas	3 - 9
Anormalidades estruturais do sistema nervoso central	7 - 17
Complicações da prematuridade	2 - 10
Ambiente/teratógenos	5 - 13
“Cultural, familiar”	3 - 12
Síndromes provisoriamente monogênicas	1 - 5
Causas metabólicas / endócrinas	1 - 5
Desconhecida	30 - 50

Devido a essa heterogeneidade e à conseqüente complexidade da investigação diagnóstica da DM, a classificação dos diferentes fatores causais relacionados a essa manifestação é bem variada, mas é comum que sejam genericamente considerados como de origem ambiental ou genética, sendo os mesmos utilizados neste estudo (16).

1.2. Fatores Etiológicos da DM

1.2.1. Fatores Ambientais

Em geral, entre os fatores ambientais que podem estar associados à DM estão a exposição a agentes teratogênicos, tais como álcool e outras drogas, hipertermia, radiação, infecções como rubéola, toxoplasmose, sífilis e citomegalovirose, entre outros. Também se destacam a falta de assistência médica adequada durante gestação e parto, complicações peri e neonatais, como trabalho de parto prolongado, hipóxia, prematuridade e convulsões, privação sócio-cultural, desnutrição protéico-calórica, traumatismos cranianos, infecções do sistema nervoso central ou mesmo a combinação de diversos fatores (16,17,18).

1.2.2. Fatores genéticos

Entre as causas genéticas de DM, destacam-se as cromossomopatias, em particular a síndrome de Down, as heredopatias de transmissão monogênica, com destaque para os erros inatos do metabolismo, e o grupo da DM ligada ao X, incluindo a síndrome do X-Frágil (SXF) e todas as outras condições que se associam ou têm a DM como manifestação principal e são determinadas por genes do cromossomo X. Outros mecanismos, como erros na impressão genômica e dissomia uniparental também são descritos, por exemplo, em um percentual dos indivíduos com as síndromes de Angelman e Prader-Willi (19,20,21,22,12).

A síndrome de Down, ou trissomia do cromossomo 21, é o mais frequente e conhecido dos distúrbios cromossômicos e a causa genética mais comum de DM. Foi descrita clinicamente pela primeira vez em 1866, por Sir John Langdon Down, porém sua origem genética só foi estabelecida em 1959 por Lejeune *et al.* (23,24,25,26). Ocorre em cerca de 1:600-700 a 1:1000 neonatos, de ambos os sexos e em todas as etnias, regiões geográficas e classes sociais (27,28). Em 95% dos pacientes, é determinada por trissomia regular do cromossomo 21, cerca de 4% apresentam uma translocação robertsoniana entre o braço longo do cromossomo 21 e o de um dos outros cromossomos acrocêntricos (geralmente o 14 ou 22), e ainda uma pequena porcentagem apresenta mosaïcismo, com uma das linhagens celulares trissômica. Entre as principais características, esses indivíduos apresentam hipotonia, estatura baixa, fendas palpebrais desviadas para cima, pregas epicânticas, ponte nasal baixa, macroglossia, implantação baixa das orelhas, pescoço curto, prega palmar transversal única, cardiopatia e obesidade, entre outras características. Porém, a manifestação principal é a DM, em geral de grau moderado a grave (25,27,26).

Com relação ao grupo da DM ligada ao cromossomo X, a SXF se destaca por ser considerada a principal causa hereditária e a segunda fonte genética de DM, sendo superada apenas pela síndrome de Down, ocorrendo em aproximadamente 1:4000 a 1:6000 homens. A denominação “X-Frágil” se refere a

uma região mais sujeita a quebras ou falhas, ou seja, um “sítio frágil” no qual a cromatina não se condensa apropriadamente durante a mitose, situado em Xq27.3. Na quase totalidade dos casos é causada por uma mutação dinâmica, caracterizada pela expansão de uma sequência de trinucleotídeos CGG, situada na região 5' não-traduzida do primeiro exon do gene *FMR1* (*Fragile-X Mental Retardation*). O número normal de repetições é aproximadamente 60, enquanto em pacientes com a SXF ocorrem centenas de repetições. Mais de 200 cópias da repetição levam a uma metilação excessiva de citosinas no promotor de *FMR1*, uma forma de modificação do DNA que impede o funcionamento normal e silencia o gene (29,27,25).

A deficiência funcional da proteína codificada pelo gene *FMR1*, denominada FMRP, deve estar vinculada ao fenótipo da SFX, que inclui, além da DM (em geral, de moderada a grave no sexo masculino), distúrbios de comportamento e linguagem, face alongada e mandíbula proeminente, orelhas grandes e/ou em abano e macrorquidia, comumente observados a partir da puberdade (29,27,25).

Quanto às diversas outras heredopatias de transmissão monogênica relacionadas à DM, também merecem menção os erros inatos do metabolismo, pois entre centenas já descritos, grande parte se relaciona a alterações bioquímicas que afetam principalmente o metabolismo de aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios e carboidratos complexos e interferem no desenvolvimento do sistema nervoso central, produzindo diversas alterações neurológicas e somáticas, além da DM (30).

Recentemente, o refinamento das técnicas de citogenética e genética molecular possibilitou um avanço dos recursos diagnósticos, ampliando o conhecimento quanto à etiologia da DM. Assim, foi possível identificar outros mecanismos genéticos também responsáveis por essa condição, como os erros de impressão genômica e dissomia uniparental, que ocorrem na síndrome de Angelman e síndrome de Prader-Willi. Ambas são afecções neurogenéticas clinicamente distintas, resultantes da perda de expressão de genes sujeitos ao *imprinting* na região cromossômica 15q11q13, de origem materna ou paterna,

respectivamente. Além da DM, que pode variar de moderada a grave, essas condições são caracterizadas por microcefalia, hiperatividade, ausência de fala, atração por água, riso imotivado, além de marcha atáxica na síndrome de Angelman, e hipotonia nos primeiros meses de vida, obesidade mórbida, letargia, baixa estatura, hipoplasia genital, hipogonadismo hipogonadotrófico, e comportamento manipulador e obsessivo na síndrome de Prader-Willi. Os três mecanismos genéticos mais frequentemente responsáveis por ambas são deleção da região 15q11q13, dissomia uniparental e mutações no centro de *imprinting*. Com uma ocorrência de 1:10000 a 1:15000 indivíduos, as duas síndromes podem ser diagnosticadas clinicamente e por métodos citogenéticos e moleculares (31,32,33).

Outra causa mais recentemente apontada como associada a DM são os rearranjos subteloméricos, descritos no item a seguir.

1.3. Rearranjos subteloméricos em DM idiopática

Diversos estudos vêm demonstrando o envolvimento dessas regiões em muitos casos de DM idiopática, como demonstrado na Tabela II.

Tabela II Revisão de estudos envolvendo triagem de indivíduos com DM relacionados a rearranjos subteloméricos.

Referência	Método de análise	Número de casos estudados	Deteccção (%)
Flint <i>et al.</i> , 1995 (34)	VNTR	99	6,0
Viot <i>et al.</i> , 1998 (35)	FISH multiprobe	17	23,0
Vorsana <i>et al.</i> , 1998 (36)	FISH multiprobe	209	8,0
Knight <i>et al.</i> , 1999 (37)	FISH multiprobe	466	4,7
Lamb <i>et al.</i> , 1999 (38)	FISH multiprobe	43	2,3
Slavotinek <i>et al.</i> , 1999 (39)	Análise de microssatélite	27	7,5
Ballif <i>et al.</i> , 2000 (40)	FISH	154	2,6
Bonifacio <i>et al.</i> , 2001 (41)	PRINS	65	3,1

Borgione <i>et al.</i> , 2001 (42)	Análise de microssatélite	60	6,6
Colleaux <i>et al.</i> , 2001 (43)	Análise de microssatélite	29	6,9
Fan <i>et al.</i> , 2001 (44)	FISH multiprobe	150	4,0
Joly <i>et al.</i> , 2001 (45)	FISH multiprobe; CGH	14	35,7
Joyce <i>et al.</i> , 2001 (46)	FISH multiprobe	200	0,0
Riegel, <i>et al.</i> , 2001 (47)	FISH multiprobe	254	5,0
Rosenberg <i>et al.</i> , 2001 (48)	Análise de microssatélite	120	4,1
Rossi <i>et al.</i> , 2001 (49)	FISH multiprobe	200	6,5
Sismani <i>et al.</i> , 2001 (50)	FISH multiprobe	70	1,4
Anderlid <i>et al.</i> , 2002 (51)	MAPH	111	9,0
Baker <i>et al.</i> , 2002 (52)	FISH multiprobe	250	4,0
Clarkson <i>et al.</i> , 2002 (53)	FISH multiprobe; SKY	50	4,1
Dawson <i>et al.</i> , 2002 (54)	FISH multiprobe	40	6,0
Hellias-Rod <i>et al.</i> , 2002 (55)	FISH multiprobe	33	9,1
Hollox <i>et al.</i> , 2002 (56)	MAPH	37	13,5
Popp <i>et al.</i> , 2002 (57)	M-TEL	30	13,3
Rio <i>et al.</i> , 2002 (58)	Análise de microssatélite	150	10,7
Van Karnebeek <i>et al.</i> , 2002 (59)	FISH multiprobe	184	0,5
Hulley <i>et al.</i> , 2003 (60)	FISH multiprobe	13	7,7
Jalal <i>et al.</i> , 2003 (61)	FISH multiprobe	372	6,8
Bocian <i>et al.</i> , 2004 (62)	FISH multiprobe	59 mod a grave 24 leve	10,0 12,5
Borck <i>et al.</i> , 2004 (63)	Análise de microssatélite	97	3,1
Harada <i>et al.</i> , 2004 (64)	array-CGH	69	5,8
Koolen <i>et al.</i> , 2004 (65)	MLPA	210	6,7
Kriek <i>et al.</i> , 2004 (66)	MAPH	188	4,3
Li e Shao <i>et al.</i> , 2004 (67)	FISH multiprobe	46	4,4
Noveli <i>et al.</i> , 2004 (68)	FISH multiprobe	92	16,3
Pickard <i>et al.</i> , 2004 (69)	MAPH; FISH	69 leve	1,5
Rodriguez-Revenge <i>et al.</i> 2004 (70)	FISH multiprobe	8 mod a grave 22 leve	12,5 4,5
Rooms <i>et al.</i> , 2004 a (71)	MLPA	75	5,2
Rooms <i>et al.</i> , 2004 b (72)	Análise de microssatélite	70	-
Shaw-Smith <i>et al.</i> , 2004 (73)	array-CGH	50	14,0

Walter <i>et al.</i> , 2004 (74)	FISH multiprobe	50	10,0
Adeyinka <i>et al.</i> , 2005 (75)	T-FISH	2170	5,6
Baroncini <i>et al.</i> , 2005 (76)	FISH multiprobe	219	5,5
Caliskan <i>et al.</i> , 2005 (77)	T-FISH	10	20,0
De Vries <i>et al.</i> , 2005 (78)	array-CGH	100	10,0
Kok <i>et al.</i> , 2005 (79)	array-CGH	100	8,0
Moog <i>et al.</i> , 2005 (80)	T-FISH	102	5,9
Rosenberg <i>et al.</i> , 2005 (81)	array-CGH	81	16,0
Schoummans <i>et al.</i> , 2005 (82)	array-CGH	41	9,8
Velagaleti <i>et al.</i> , 2005 (83)	FISH multiprobe	18	11,1
Cogulu <i>et al.</i> , 2006 (84)	FISH	30	3,3
Delague <i>et al.</i> , 2006 (85)	Análise de microsatélite	45	6,6
Erjavec-Sker <i>et al.</i> , 2006 (86)	T-FISH;MLPA,arrayCGH	100	10,0
Friedman <i>et al.</i> , 2006 (87)	array-CGH	100	11,0
Lam <i>et al.</i> , 2006 (10)	MLPA; FISH	20	15,0
Menten <i>et al.</i> , 2006 (88)	array-CGH	140	13,6
Miyake <i>et al.</i> , 2006 (89)	array-CGH	30	16,0
Monfort <i>et al.</i> , 2006 (90)	MLPA; FISH	95	9,3
Palomares <i>et al.</i> , 2006 (11)	MLPA; FISH	50	5,0
Ravnan <i>et al.</i> , 2006 (91)	FISH	11688	3,0
Rooms, <i>et al.</i> , 2006 (92)	MLPA; FISH	275	4,36
Saugier-Veber <i>et al.</i> , 2006 (93)	QMPFSF	293	1,0
Sharp <i>et al.</i> , 2006 (94)	array-CGH	290	5,5
Ahn <i>et al.</i> , 2007 (95)	MLPA; FISH	455	5,9
Ballif <i>et al.</i> , 2007 (96)	array-CGH; FISH	6946	2,4
Kriek <i>et al.</i> , 2007 (97)	MLPA; FISH; array-CGH	58	27,5
Ruiter <i>et al.</i> , 2007 (98)	MLPA; FISH	466	5,4
Wu <i>et al.</i> , 2007 (99)	MLPA; FISH	39	10,0
Park <i>et al.</i> , 2008 (100)	FISH multiprobe	100	1,1
Shao <i>et al.</i> , 2008 (101)	array-CGH	236	4,4
Stegmann <i>et al.</i> , 2008 (102)	MLPA; FISH	466	3,9
Stoeva <i>et al.</i> , 2008 (103)	array-CGH; FISH; MLPA	76	19,7

Entre os primeiros estudos se destaca o de Knight *et al.* (37) que, ao estudarem uma amostra de indivíduos com DM idiopática, constataram rearranjos subteloméricos em uma frequência de 7,4% entre os indivíduos com DM de moderada a grave, e em 0,5% dos indivíduos com DM leve. Tais resultados foram corroborados por Anderlid *et al.* (51). Entretanto, estudos mais recentes mostraram uma proporção maior de indivíduos com alterações subteloméricas entre aqueles com DM leve, variando de 10% a 33%, sendo esses valores possivelmente explicados pelo tamanho da amostra e pelos critérios de seleção dos indivíduos estudados (51,62). De todo modo, a revisão da literatura realizada por De Vries *et al.* (104), constatando que em 2500 indivíduos com DM cerca de 5% apresentavam rearranjos cromossômicos envolvendo regiões subteloméricas, coloca tais rearranjos como a causa mais comum de DM classificada como idiopática, justificando, dessa forma, a inclusão do seu estudo na investigação diagnóstica dessa condição.

1.4. Investigação de rearranjos subteloméricos em DM idiopática

Telômeros são estruturas constituídas por DNA e proteínas e estão localizadas nas porções finais dos cromossomos. São regiões ricas em repetições simples TG, sendo que no caso dos vertebrados, a repetição (TTAGGG)_n varia entre 5 kb e 15 kb de extensão (105).

Entre suas funções biológicas principais estão a regulação do ciclo celular, a movimentação e a localização dos cromossomos no núcleo, assim como a atuação na segregação correta nas células-filhas, a regulação transcricional dos genes subteloméricos e o envelhecimento celular. Sem essas regiões terminais, os cromossomos tornam-se instáveis, podendo se ligar a outros cromossomos ou sofrer processos de degradação exonucleotídica. Portanto, os telômeros são essenciais para a estabilidade genômica e na replicação completa do DNA, possuindo um papel importante na longevidade celular (105,106,107).

Imediatamente após essas repetições (TTAGGG)_n *em tandem*, encontram-se famílias de DNA repetitivo que se estendem por centenas de kilobases, denominadas como região subtelomérica e, em geral, localizadas nos 500 kb terminais de cada braço cromossômico (108,109).

Flint *et al.* (110), analisando sequências gênicas adjacentes aos telômeros nos cromossomos 4p, 16p e 22p, sugeriram que a região de (TTAGGG)_n degenerado, localizada após a região de sequências (TTAGGG)_n *em tandem*, pode ser subdividida em regiões subteloméricas distal e proximal, com padrões diferentes de homologia entre os cromossomos (110).

O tamanho e a complexidade das regiões subteloméricas tornam a sua análise molecular muito difícil. Frequentemente, as sequências apresentam 90% a 95% de similaridade, sendo essa homologia estendida em muitas kilobases. Por exemplo, nos 30 kb terminais, a homologia existente entre os braços p e q do cromossomo 4 é de 98% (110,111). É essa similaridade significativa que possivelmente justifica o mecanismo chamado *cross talk*, muito observado entre essas regiões durante a meiose, podendo resultar em rearranjos cromossômicos (108).

Embora os rearranjos subteloméricos descritos por muitos estudos envolvam porções específicas, é provável que a alta interação entre sequências subteloméricas homólogas iniciem o processo de recombinação nessas regiões (112). Apesar do mecanismo de duplicação e separação das regiões cromossômicas terminais ainda não estar totalmente elucidado, já se tem conhecimento de que erros podem ocorrer e que mutações envolvendo tais regiões podem ser herdadas com ou sem consequências clínicas, e podem estar associadas a diversas doenças genéticas (113,112).

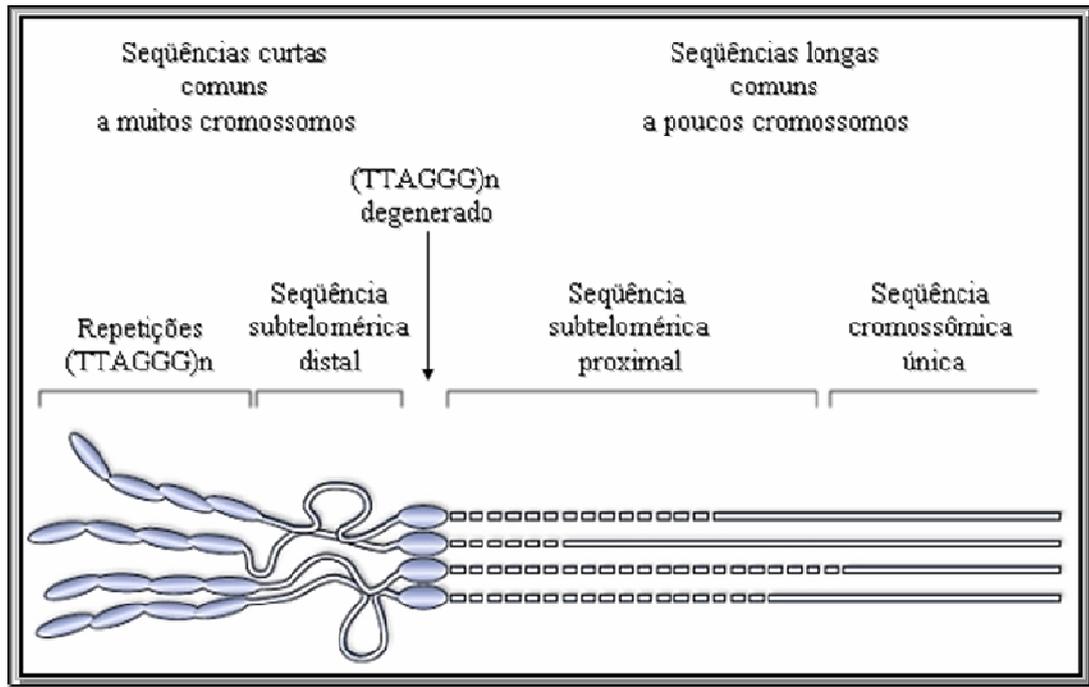


Figura 1 Organização das regiões teloméricas e subteloiméricas dos cromossomos [adaptado de Flint *et al.* (110)].

Segundo Saccone *et al.* (114), Xu e Chem (14) e Rodriguez-Revena *et al.* (69), as regiões adjacentes aos telômeros possuem várias características que as tornam candidatas ao estudo de rearranjos, como causa de doenças genéticas. Entre essas, estão a quase ausência de histonas e nucleossomos, a riqueza em genes e ilhas CpG e a alta probabilidade de recombinação, levando à observação de que rearranjos nessas regiões poderiam ter maiores consequências fenotípicas do que aqueles que envolvessem outras partes do genoma. Sendo assim, alterações nessas regiões cromossômicas poderiam contribuir significativamente para a proporção de casos de DM (6).

Na análise cromossômica convencional, as regiões subteloiméricas são difíceis de analisar, pois são morfologicamente muito similares e em sua grande maioria correspondem a bandas G negativas. Apesar disso, em indivíduos com anomalias congênitas múltiplas, atraso no desenvolvimento ou suspeita de outra anormalidade cromossômica, o exame de cariótipo convencional é ainda o primeiro a ser realizado, em geral com uma resolução que varia de 450 a 850 bandas por lote haplóide, a fim de facilitar a detecção de deleções, duplicações ou

rearranjos cromossômicos relativamente pequenos. Normalmente, o tecido escolhido para análise é o sangue periférico, contudo, quando há suspeita de mosaicismo, deve aumentar o número de metáfases analisadas; além disso, tecidos de outra origem embrionária, como por exemplo, fibroblastos obtidos a partir de biópsia de pele, podem ser utilizados para cultura celular (115,116,117).

Já quando a resolução da análise permanece entre 3 – 5 Mb, rearranjos menores devem ser detectados por outras técnicas (51,118).

Entre as técnicas utilizadas para a análise das regiões subteloméricas pode-se destacar a Hibridização *In Situ* por Fluorescência (*fluorescent in-situ hybridization* ou FISH), a Hibridização Genômica Comparativa (CGH), a Análise de Microssatélites, *Multiplex Amplification and Probe Hybridization* (MAPH) e *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification* (MLPA) (39,119,120,14).

1.4.1. A técnica de FISH

Uma técnica bastante utilizada para detectar rearranjos subteloméricos é a de FISH, na qual sondas fluorescentes específicas são hibridizadas ao cromossomo-alvo. Com essa técnica é possível a identificação dos segmentos pela homologia entre as sequências do DNA e não mais pela similaridade das bandas visíveis na análise convencional. Assim, podem ser observados rearranjos cromossômicos e deleções submicroscópicas menores do que 2 – 3 Mb, não visíveis em técnicas de bandamento convencionais (117,118).

Utilizando essa técnica, as deleções podem ser detectadas pela ausência de sinal e as trissomias pela presença de três sinais nas porções finais dos cromossomos. A localização dos sinais é evidente a partir da caracterização citogenética, de modo que translocações balanceadas e não balanceadas podem ser identificadas. Em contrapartida, os mesmos estudos que demonstram as vantagens dessa técnica, advertem para seu custo, complexidade e também para o fato de ser trabalhosa, além da limitação referente à especificidade ao DNA-alvo (104,121,65,120,92,90).

Quanto à especificidade ao DNA-alvo, a técnica de FISH é bastante apropriada na detecção de síndromes genéticas já associadas a anormalidades cromossômicas, haja vista a necessidade de confecção de sondas específicas à região em questão. Por essa razão, o método não é apropriado se a condição ainda não se encontra bem esclarecida quanto a sua origem genética (117).

Com relação ao estudo da DM idiopática, muitos são os estudos que utilizam o método de FISH para a investigação de rearranjos subteloméricos relacionados a essa condição, ou seja, das regiões subteloméricas de todos os braços cromossômicos, com exceção dos acrocêntricos. Assim, Baker *et al.* (52), estudando, por meio de FISH, 250 pacientes, sendo 53 com DM idiopática/atraso no desenvolvimento e 197 com DM/atraso no desenvolvimento associado a sinais dismórficos e/ou defeitos congênitos observaram rearranjos subteloméricos em 3,6% dos casos: 1/53 pacientes no primeiro grupo (1,9%), e 8/197 no segundo grupo (4,1%). A explicação para esses valores estaria mais concentrada nos critérios de seleção utilizados para o estudo. A mesma observação é salientada no trabalho publicado por Adeyinka *et al.* (75). Segundo esses autores, os critérios de seleção dos pacientes corresponderiam ao primeiro fator a ser considerado para justificar a diferença na porcentagem de casos com alteração. De todo modo, ambos os estudos atentam para a importância da utilização da técnica de FISH na detecção de rearranjos subteloméricos em DM idiopática (75).

Em 2004, Rodríguez-Revenga *et al.* (122) detectaram rearranjos subteloméricos em 6,7% dos 30 pacientes selecionados, nos quais entre os critérios de inclusão estavam a análise citogenética normal, nenhuma síndrome reconhecível clinicamente, presença de sinais dismórficos e história familiar de DM em alguns casos. Dentre os 30 pacientes, 22 apresentavam DM moderada a grave. Quando pertinente, as síndromes do X-frágil, Angelman ou Prader-Willi foram excluídas. Segundo esses autores, a porcentagem de casos positivos esteve de acordo com estudos anteriores, que também utilizaram a técnica de FISH para triagem de rearranjos subteloméricos. Apesar de ser laboriosa e de custo alto, a técnica de FISH tem sua utilização justificada para a detecção de

anormalidades subteloméricas, principalmente quando combinada a outros protocolos e critérios adequados de seleção de pacientes (122).

1.4.2. A técnica de *array*-CGH

A técnica de CGH (Hibridização Genômica Comparativa), assim como a de FISH, é capaz de detectar perdas e ganhos cromossômicos, e diferentemente da análise citogenética convencional, dispensa a cultura celular para a obtenção de preparações metafásicas do indivíduo a ser examinado, utilizando, para tanto, o seu DNA. Além disso, não há desvio para a análise de uma região cromossômica específica, ou seja, todo o genoma é analisado (121).

Na técnica de CGH convencional, o DNA genômico do indivíduo e o de referência (normal) são marcados com fluorocromos distintos e, posteriormente, são misturados e aplicados sobre metáfases normais, para que haja uma competição dos mesmos na hibridização. Entretanto, a resolução é semelhante à obtida por bandamento G (5 – 8 Mb), não sendo eficaz para a detecção de anormalidades cromossômicas muito pequenas. Dessa maneira, não possui muita aplicação na genética clínica, sendo utilizada na grande maioria das vezes para a detecção de anormalidades genômicas em câncer (14,120).

No final da década de 90, Pinkel *et al.* (123) descreveram pela primeira vez a técnica de CGH baseada em *arrays* (*array*-CGH), que utiliza sondas de DNA genômico 'inseridas' em lâminas, ao invés de preparações cromossômicas, como na técnica de CGH convencional. Com o advento dessa técnica, que possui uma resolução de até alguns kb, dependendo somente do tamanho e da distância entre as sondas, a análise de ganhos e perdas genômicas relacionadas a doenças genéticas, incluindo rearranjos subteloméricos relacionados à DM idiopática, pôde ser realizada (124,125,115,126).

Dessa maneira, vários estudos procuram analisar a viabilidade da técnica na investigação de rearranjos subteloméricos relacionados à DM idiopática (73,79,127,81,89,128,129). Como exemplos, Veltman *et al.* (119) testaram a funcionalidade da técnica na triagem de alterações gênicas em regiões

subteloméricas de indivíduos com DM, associada ou não a anormalidades congênitas. Para tanto, utilizaram amostras de DNA genômico de 20 pacientes com anormalidades genéticas envolvendo uma ou mais regiões subteloméricas, detectadas por outras técnicas. Como resultado, observaram que ganhos ou perdas gênicas nesses ensaios mostraram concordância significativa entre o diagnóstico citogenético e o baseado em *array*-CGH. Além desses achados, os autores observaram outros três rearranjos subteloméricos não detectados previamente nesses pacientes. Dessa maneira, a eficácia da triagem de rearranjos subteloméricos realizada por *array*-CGH confirmou sua aplicabilidade no diagnóstico clínico (119).

Schoumans *et al.* (130), utilizando a técnica de *array*-CGH para a detecção de rearranjos cromossômicos em crianças com DM idiopática, observaram quatro deleções *de novo*, todas confirmadas pela técnica de FISH, método “padrão ouro” de análise, sinalizando a eficácia do método (130).

A revisão realizada por Stankiewicz e Beaudet (131) já contabiliza mais de 13 estudos envolvendo a técnica de *array*-CGH e pacientes com DM de origem a esclarecer, sendo que a detecção de anormalidades cromossômicas está de acordo com as observadas por outros métodos (64,88). Com base nos resultados obtidos por esses estudos foi possível estimar as vantagens e desvantagens do uso dessa técnica.

Entre as vantagens do método de *array*-CGH, está a de não ser necessária a obtenção de cromossomos metafásicos (ao contrário da análise por bandamento ou mesmo por FISH), a rapidez de finalização do experimento (na técnica de FISH comumente são necessários mais de sete dias para a conclusão), a praticidade (todo um genoma é analisado em uma mesma reação) e a sensibilidade (é capaz de detectar qualquer rearranjo desbalanceado e genes candidatos para diversas condições), auxiliando na identificação de diversas síndromes novas (124,131,101).

A grande desvantagem é a de não ser capaz de detectar rearranjos balanceados, além do custo alto, por vezes não condizente com a infra-estrutura da instituição e inviabilizando a aplicação em programas de triagem (14).

1.4.3. A técnica de MAPH

A técnica *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation* (MAPH), ou Amplificação Múltipla de Sondas Hibridizadas, primeiramente descrita em 2000 por Armour *et al.* (132) possui como princípio uma combinação de sondas hibridizadas ao DNA genômico e amplificadas pela Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), visando a detecção de variações no número de cópias gênicas, menores que 150 pb (132).

Nessa técnica, o DNA genômico é desnaturado e fixado em uma membrana de *nylon*, e então hibridizado a uma série de sondas, que podem ser desenhadas especificamente para todo e qualquer locus, telômero ou região cromossômica. Essas sondas são marcadas por radioatividade ou, mais recentemente, por fluorescência, e correspondem às sequências de interesse no estudo. Após a hibridização, a membrana é lavada para a retirada das sondas excedentes, que não sofreram anelamento às regiões estudadas. Desse modo, as sondas restantes estarão presentes proporcionalmente à presença do número de cópias do segmento no genoma (133,134).

Em seguida, as sondas são retiradas da membrana e amplificadas simultaneamente, por meio de um par de *primers* universal, pela técnica de PCR. Os produtos são, então, separados por eletroforese (capilar ou por gel de poliacrilamida) e é realizada uma comparação relativa desses resultados com os de um DNA normal (controle sem alteração). A redução da intensidade da banda ou da área do pico comparada ao controle interno indica uma redução no número de cópias gênicas, enquanto que um aumento nessa intensidade refere-se a uma duplicação (133,134).

Recentemente, foi desenvolvida a técnica de *array*-MAPH, a partir de algumas modificações no protocolo original, determinando um ajuste do método de gel eletroforese capilar para o formato *array*. Os primeiros estudos envolvendo a técnica modificada apontam alguns fatores limitantes para a aplicação clínica, como a quantidade de DNA utilizada no ensaio e a possibilidade de falsos positivos. Entretanto, a otimização do método pode aperfeiçoar a reprodutibilidade

e a dinâmica, abrindo novas possibilidades para detecção de alterações no número de cópias no genoma humano (134,135,136).

São muitas as indicações da técnica de MAPH, entre as quais se destacam a detecção de deleções em genes como *DMD*, relacionado à distrofia muscular de Duchenne (137,138), *SNRPN*, relacionado às síndromes de Angelman e Prader-Willi (132), *MSH2* e *MLH1*, relacionados ao câncer colo-retal hereditário não polipóide (139), além da detecção de aneuploidias e de rearranjos subteloméricos (69), esses últimos relacionados a DM idiopática (50,56).

Kriek *et al.* (66), estudando rearranjos subteloméricos em 188 indivíduos com DM de origem não esclarecida pela técnica de MAPH, observaram 19 alterações gênicas, sendo que 69% delas não foram detectadas por análise citogenética convencional. Entre as alterações observadas estão as deleções terminais del(1p), del(6p), del(6q), del(7p), del(16p) e del(18q). Já entre as duplicações subteloméricas encontram-se dup(1p) e dup(20q). A partir desses resultados, os autores sugerem a aplicação do método em programas de triagem, atentando para o fato de que outras tecnologias, como MLPA e *array*-CGH vêm despontando para o mesmo objetivo (66).

Segundo Sellner e Taylor (133), as técnicas de MAPH e MLPA são bastante similares, pois permitem avaliar pequenas perdas ou ganhos de material genético com eficácia alta. Entretanto, apesar das semelhanças, a técnica de MAPH exige maior quantidade de DNA genômico e ainda há possibilidade de que sondas que não sofreram hibridização, quando não retiradas completamente durante a lavagem, sejam amplificadas, levando a um resultado incorreto. Já quanto a MLPA, a fase de ligação remove a necessidade do uso do filtro e da etapa de lavagem, sendo, portanto, mais indicada. Dessa forma, além de ser um tanto laboriosa, a técnica de MAPH é mais passível de sofrer contaminação quando comparada a técnica de MLPA (140,133,118).

1.4.4. A técnica de MLPA

A técnica denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método sensível, econômico, rápido e simples, que visa a quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (141,142).

Descrita por Schouten *et al.* (141), e posteriormente comercializada pela empresa holandesa MRC-Holland (143), a técnica de MLPA se baseia em um princípio simples, em que a amostra de DNA genômico é hibridizada a uma mistura de sondas, com amplificação posterior dos produtos de ligação por PCR, utilizando um par de *primers* universal. Os fragmentos finais são, então, separados e lidos em aparelho de eletroforese capilar, sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas (141).

É constituída por quatro fases: Desnaturação, Hibridização, Ligação e Amplificação. Nas duas primeiras, o DNA genômico é desnaturado, e então hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica para a região a ser estudada). Cada sonda é formada por dois oligonucleotídeos, que são contíguos ao se anelarem ao DNA, e são construídos da seguinte maneira:

Oligonucleotídeo A: possui um tamanho variável de 50 – 60 pb e contém um marcador fluorescente (para reconhecimento), seguido de uma sequência homóloga ao *primer* universal X (correspondendo à região pela qual esses *primers* universais serão anelados, posteriormente) (em roxo; Figura 2), além da sequência de hibridização homóloga ao DNA-alvo (em azul claro; Figura 2).

Oligonucleotídeo B: possui um tamanho variável entre 60 – 450 pb e contém uma sequência homóloga ao *primer* universal Y (em lilás, Figura 2), seguido de uma sequência-coringa (com extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais) (em verde, Figura 2) e uma sequência de hibridização homóloga ao DNA-alvo (em azul escuro, Figura 2) (141,71,120,95).

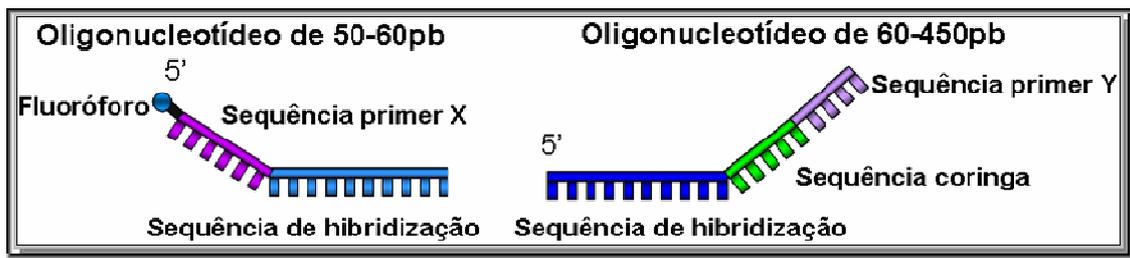


Figura 2 Constituição dos oligonucleotídeos das sondas de MLPA (Modificado de 143).

Esses oligonucleotídeos, quando submetidos à temperatura de anelamento, hibridizam-se a sequências complementares ao DNA-alvo e, a seguir, em temperatura ambiente, são unidos por uma enzima ligase dependente de temperatura (Fase de Ligação), formando um fragmento único (Figura 3).

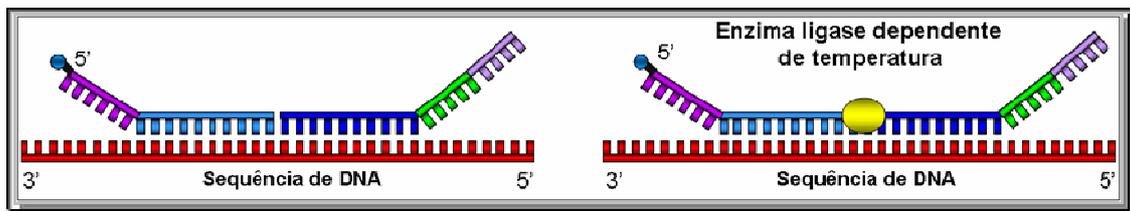


Figura 3 Anelamento dos oligonucleotídeos na sequência de DNA genômico e posterior união desses oligonucleotídeos pela enzima ligase dependente de temperatura (Modificado de 143).

Dessa forma, como resultado da reação de ligação, são obtidos fragmentos únicos, com a seguinte disposição: fluoróforo – região de ligação ao *primer* universal – sequência complementar ao DNA alvo – sequência coringa – região de ligação ao *primer* universal (Figura 4) (141,71,120,95).

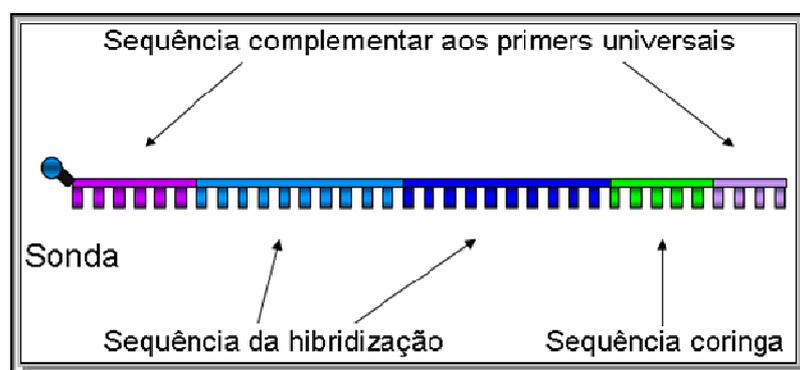


Figura 4 Fragmento único resultante da reação de ligação, intermediada pela enzima ligase dependente de temperatura, e sua disposição quanto às partes que a compõem (Modificado de 143).

Após a ligação, inicia-se a fase de amplificação, na qual os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, utilizando-se *primers* universais que se anelam às sequências não-homólogas situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação (Figura 5) (141,71,120,95).

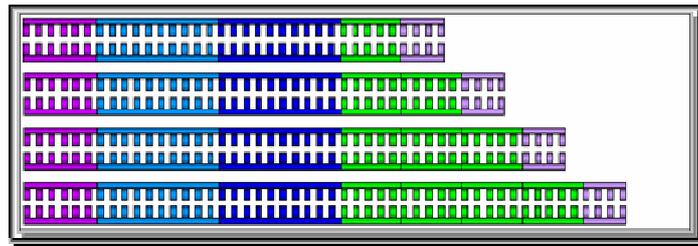


Figura 5 Resultado da amplificação dos produtos de ligação através de PCR, com a utilização de *primers* universais (143).

Em seguida, tais produtos são separados em aparelho de eletroforese capilar e podem ser analisados em relação aos controles sem alteração, a partir de programa específico de genotipagem. Dados de área ou altura de pico de cada produto de amplificação podem ser utilizados na normalização, e refletem o número relativo de cópias de cada sequência-alvo, permitindo, por exemplo, que o número de cópias localizadas nas extremidades cromossômicas que sofreram deleção ou duplicação sejam identificadas (Figura 6) (141,71,120,95).

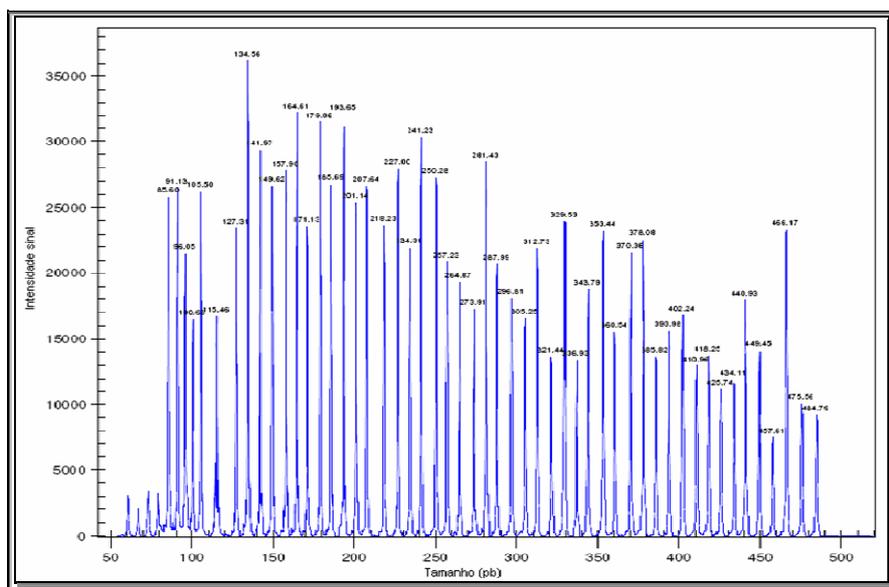


Figura 6 Exemplo de separação e quantificação por eletroforese capilar (Modificado de 143).

Segundo o fabricante dos *kits*, a técnica de MLPA possui algumas vantagens em relação a outras já utilizadas para a detecção de alterações genômicas, entre as quais se destacam a detecção de mais de 50 sequências de DNA genômico em uma mesma reação, utilizando somente 20 ng de DNA humano (rendimento alto); necessidade de apenas um termociclador e um sistema de eletroforese capilar para a realização da técnica, que disponibiliza os resultados em 24 horas (praticidade alta e rapidez); possibilidade de inclusão de muitas amostras em um mesmo ensaio (reprodutibilidade); capacidade de detectar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo; protocolo único para muitas aplicações diferentes; e custo relativamente baixo do ensaio por paciente (143).

São muitas as indicações dessa técnica, que é considerada eficiente para a detecção de deleções e duplicações de exons em diferentes genes, como *BRCA1* no câncer de mama (144), *MSH2* e *MLH1* no câncer colo-retal hereditário não polipóide (141,145), *DMD* na distrofia muscular de Duchenne (146,147,148,149), *TSC1* e *TSC2* na esclerose tuberosa (150) e *CCM1* nas malformações cerebrais familiares (151), craniossinostoses (152), assim como para o diagnóstico de aneuploidias em exames pré-natais (153,154,155) e estudo de abortos espontâneos (156,157), entre outros.

A técnica de MLPA vem se mostrando bastante eficiente também para o estudo de metilação dos genes *SNRPN* e *UBE3A* em síndrome de Prader-Willi e síndrome de Angelman (158,159,160), para a investigação de leucemias (161), anormalidades do cromossomo 22 (162,163), neurofibromatose (164), holoprosencefalia (165), hiperplasia adrenal congênita (142), surdez não síndrômica (166), além da pesquisa de rearranjos subteloméricos.

Quanto à pesquisa de DM relacionada a rearranjos subteloméricos, como a maioria desses envolve duplicação ou deleção de um único subtelômero, o fabricante disponibiliza testes comerciais para cada região. Como exemplo, para uma primeira triagem de alterações envolvendo todos os subtelômeros, são indicados os *kits* SALSA MLPA P036, P069 e P070. Já para a investigação de síndromes de microdeleção são indicados *kits* específicos para cada região, como os *kits* SALSA P064, P096, P245, entre outros (143).

Diversos estudos de investigação de rearranjos subteloméricos em DM idiopática, a partir da técnica de MLPA, tiveram resultados similares àqueles baseados em outros métodos (34,65,167,10,92), sendo alguns detalhados a seguir.

Palomares *et al.* (10) e Vorstman *et al.* (162), em estudos comparativos, utilizando as técnicas de FISH e MLPA, constataram concordância significativa entre os resultados de ambas, mas observaram maior rentabilidade e rapidez, além de custo menor, com a utilização de MLPA.

No mesmo ano, Lam *et al.* (9) publicaram um estudo sobre a prevalência de deleções subteloméricas em pacientes com DM de moderada a grave, utilizando as técnicas de MLPA e FISH. Entre os 20 pacientes testados, foram identificadas três deleções subteloméricas, entre as quais del(1p36), del(1q44) e del(10q26), não identificadas anteriormente por análise citogenética convencional. Ambos os genitores desses três casos positivos também foram investigados pelas duas técnicas, sendo o resultado normal em todos os casos. Comparando-se as técnicas utilizadas nesse estudo, os autores observaram vantagens do uso de MLPA em relação à técnica de FISH, principalmente quanto ao custo e ao tempo despendido para a realização dos testes. Com relação ao custo, segundo estimativas recentes, enquanto que o teste de FISH subtelomérico custa em torno de 250 dólares, o de MLPA sai por menos de 15 dólares por paciente. Já quanto ao tempo, um resultado de MLPA torna-se disponível para consulta em cerca de 20 horas, enquanto o de FISH requer pelo menos uma semana. Porém, é importante observar que pelo fato de a técnica de MLPA ser nova, toda alteração encontrada por ela deve ser validada com outra técnica “padrão-ouro”, como a de FISH, por exemplo (10,71,90,143,167).

Rooms *et al.* (71), analisando 75 pacientes com DM moderada a grave, em combinação com sinais dismórficos e/ou história familiar de DM pela técnica de MLPA, detectaram rearranjos subteloméricos em 5,3% desses pacientes. Foram identificados quatro rearranjos subteloméricos, sendo duas deleções terminais 1p36, uma deleção 1q terminal e uma deleção 3p terminal. Essas deleções

puderam ser confirmadas por FISH e também por análise de microssatélites, mostrando a eficácia, rapidez e sensibilidade do método (71).

Os mesmos autores, em estudo posterior (92), salientaram a importância da técnica de MLPA no diagnóstico de rearranjos subteloméricos em DM. Nesse estudo, foram encontradas alterações em 12 dos 275 indivíduos com DM idiopática testados (2,9%). Entre essas alterações, cinco foram consideradas *de novo*: del(8pter), del(15qter), dup(19pter), der(11)t(11;20)(qter;qter) e der(18)t(18;10)(qter;pter); enquanto as sete restantes foram também encontradas em pelo menos um dos genitores: del(3pter), del(6qter) em gêmeos, del(Xpter) em dois pacientes independentes, dup(5q) e dup (3qter) em dois pacientes independentes, resultados esses confirmados por outros *kits* do mesmo método e validados pela técnica de FISH. Segundo esse grupo, a importância dos resultados justifica a inclusão da técnica como rotina na triagem de rearranjos subteloméricos em indivíduos com DM de origem ainda não esclarecida (92).

A eficiência do método também foi observada no estudo de Koolen *et al.* (65) em 210 indivíduos com DM idiopática, sendo observada a presença de rearranjos subteloméricos em 6,7% deles. Outro dado importante desse estudo é que rearranjos com relevância clínica foram encontrados em todos os pacientes que anteriormente passaram pelo *checklist* para rearranjos subteloméricos proposto por De Vries *et al.* (168). Segundo tais autores, esse *checklist* auxilia na pré-seleção de casos para testes subteloméricos e é formado por itens como história familiar para DM e presença de sinais dismórficos, entre outros. Isso foi demonstrado em um estudo que incluiu pacientes com escore clínico de três ou mais desses sinais, no qual a detecção de alterações subteloméricas foi ampliada para 12,4% (65). Isso ressalta o fato de que uma avaliação clínica prévia, com especial atenção a características físicas, antecedentes familiares e pessoais, é sempre fundamental na investigação diagnóstica em DM.

Kirchhoff *et al.* (169,170), analisando 258 indivíduos com DM que apresentavam cariótipo convencional normal, utilizando inicialmente técnicas de *array*-CGH e MLPA, identificaram alterações cromossômicas em 5,8% dos casos. Entre esses pacientes, 10 foram identificados como apresentando as síndromes

de deleção 1p36, deleção 22q11, síndromes de Angelman, Prader-Willi, Miller-Dieker, Smith-Magenis, Sotos e Williams-Beurens, e outros cinco tinham duplicações. Tais resultados são indicativos de que a técnica de MLPA quando utilizada para identificação de alterações subteloméricas ou aplicada para síndromes específicas associadas a DM, pode ser uma ferramenta importante na investigação diagnóstica dessa condição (169).

Kriek *et al.* (97), estudando pacientes com atraso de desenvolvimento, também pela estratégia de combinação das técnicas de MLPA e *array*-CGH, observaram que ambas são válidas para o diagnóstico de pacientes com DM, e que a possibilidade de implementação dessas técnicas deve ser considerada. A casuística foi composta por 58 pacientes com DM, anormalias congênitas ou sinais dismórficos secundários. Todos os participantes já possuíam análise citogenética normal e estudo molecular negativo para a SXF. Nos resultados, foram detectadas 17 alterações por CGH, sendo 14 delas confirmadas por MLPA ou FISH. Comparando-se às técnicas utilizadas observou-se que três alterações potencialmente patogênicas não foram detectadas por MLPA, devido à sua localização distante da região testada. Dessa maneira, devido ao baixo custo da técnica de MLPA, esses autores propuseram a seguinte estratégia de investigação diagnóstica: quando um paciente apresenta DM de etiologia desconhecida com exame de cariótipo normal, o primeiro método de triagem a ser utilizado seria o MLPA. Como consequência, caso o resultado seja negativo, aconselha-se a utilização de *array*-CGH, uma vez que um número maior de variações de cópias gênicas pode ser detectado por essa técnica (97).

É importante ressaltar que grande parte dos estudos demonstrou a eficácia da técnica de MLPA em detectar alterações genômicas, principalmente quanto a rearranjos subteloméricos, porém há dúvidas em relação a sua sensibilidade, uma vez que em alguns houve resultados falso-positivos. Como exemplo, Monfort *et al.* (90) utilizaram três *kits* de MLPA para analisar 95 pacientes com DM idiopática associada a sinais dismórficos (não presentes em outros membros da família) e 22 controles sem alteração. Foram detectadas alterações entre os pacientes, todas confirmadas pela técnica de FISH ou análises

de microssatélites. Já no grupo controle foram detectados quatro resultados alterados, entre deleções del(6p), del(2q) e duplicações dup(10q) e dup(15p), provavelmente relacionados a polimorfismos, mostrando a necessidade de confirmação dos resultados alterados por outro *kit* da mesma técnica ou então outro método. Segundo esses autores, a técnica de MLPA apresenta um custo mais baixo, é menos laboriosa e, uma vez utilizando-se outros *kits* comerciais para a confirmação de seus resultados e detecção de polimorfismos, pode ser incluída em análises de rotina (90).

Ainda com relação à padronização, recentemente Ahn *et al.* (95) realizaram estudo que permitiu a validação do método, testando 208 pacientes, sendo 124 com anomalias já conhecidas e outros 84 incluídos para triagem de perdas subteloméricas, correspondendo a 8528 regiões genômicas analisadas. No total, foram 128 indivíduos incluídos como casos para validação, com alterações como trissomias 13, 18 e 21, anomalias de cromossomos sexuais, deleções e duplicações terminais visíveis à microscopia comum, e anomalias identificadas por multi-FISH. Após a validação foi realizado um estudo com 455 pacientes e como resultado as 184 regiões genômicas alteradas foram identificadas por pelo menos um dos *kits* de MLPA utilizados, ou seja, nenhuma região alterada deixou de ser detectada. Já o estudo com o grupo de pacientes detectou alterações gênicas em 5,9% dos 455 indivíduos, entre as quais del(1p), del(2q), del(3p), del(4q), del(6q), del(9p), del(9q) e del(17p), dup(3p), dup(5q), dup(6q), dup(8q), dup(9p), dup(9q), dup(13q), dup(15q), dup(16q), dup(19q) e dup(22q). Em quatro casos, os resultados foram confirmados pela técnica de FISH; em nove, os resultados de FISH não foram informativos para confirmar as alterações detectadas pela técnica de MLPA e em 15 as amostras não estavam disponíveis (95).

Concluindo, na década passada os rearranjos subteloméricos emergiram como uma causa importante de DM idiopática. Essas alterações contam com 5% a 7% de todos os casos de DM, ficando em uma posição intermediária em relação à síndrome de Down e à SXF. Dessa maneira, se faz necessária a elaboração de programas de triagem para alterações subteloméricas e, nesse sentido, a técnica de MLPA mostra-se eficiente, superando a de FISH

com vantagens significativas em aspectos como rendimento, rapidez (mais de 80 casos podem ser triados por semana) e custos (R\$120,94). Outras técnicas, como a de *array*-CGH, seguramente podem aumentar a detecção de anomalias em indivíduos com atraso de desenvolvimento e (ou) dismorfismos e DM, mas devido ao custo ainda se considera inviável a sua introdução em serviços ligados ao sistema público de atenção à saúde, razão pela qual a técnica de MLPA se apresenta como a melhor alternativa disponível na triagem de rearranjos subteloméricos, justificando os esforços para que passe a ser implementada a partir de pesquisas desenvolvidas nos centros que se dedicam ao estudo sistemático da origem da DM e distúrbios correlatos (95).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A deficiência mental (DM) é uma condição clínica frequente, acometendo em torno de 1% a 3% da população de países industrializados, sendo que uma porcentagem significativa dos casos (cerca de 40%) permanece de origem não esclarecida, sendo classificados como DM idiopática. Assim, o desenvolvimento de técnicas que permitam o refinamento da investigação diagnóstica dessa condição tem sido o objetivo de numerosos estudos ao longo de décadas.

Estudos atuais têm indicado que os rearranjos subteloméricos devem ter importância significativa entre as causas genéticas de DM, podendo até se constituir no segundo fator determinante dessa condição, superando a SXF e sendo menos frequente apenas que a síndrome de Down (104).

O método de MLPA, entre outras vantagens, se apresenta como um instrumento promissor para a detecção de rearranjos subteloméricos associados à DM, conforme constatado por diversos estudos. Dessa forma, seria oportuna a sua implantação em centros que se dedicam ao estudo sistemático da etiologia da DM ou do atraso do desenvolvimento neuromotor, como o serviço de Genética Clínica da Unicamp.

A partir da padronização e da implantação dessa técnica, seria possível disponibilizar o método como rotina na investigação diagnóstica da DM, para avaliar a eventual ocorrência de rearranjos subteloméricos entre indivíduos com DM de causa indeterminada, contribuindo para melhor caracterização de vários quadros sindrômicos associados a essa manifestação, especialmente tendo em vista a ausência de estudos similares na população brasileira. Vale destacar que a perspectiva de uma conclusão diagnóstica deverá contribuir para o estabelecimento de estratégias de tratamento e prevenção, aprimorando o processo de aconselhamento genético.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Implantação da técnica molecular de MLPA no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) em colaboração com o DGM/FCM-Unicamp.
- Estudo de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática por meio do método.

3.2. Objetivos Específicos

- Revisão e atualização da literatura quanto à técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).
- Definição das alternativas mais viáveis para o desenvolvimento da técnica em questão, tendo em vista a infra-estrutura disponível na instituição.
- Implantação da técnica e aplicação em uma amostra de indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM de origem não esclarecida.
- Validação dos resultados alterados, pelos métodos de Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) ou seqüenciamento.
- Discussão da viabilidade do método como triagem para a detecção de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCM/UNICAMP) em 10/01/2007, com o N°629/2006 (ANEXO1).

A partir do levantamento bibliográfico de padronização e implantação da técnica de MLPA em centros de pesquisa, a estratégia adotada no CBMEG e no DGM-FCM-Unicamp é detalhada a seguir.

4.1. Padronização da técnica de MLPA

4.1.1. Amostra inicial

Inicialmente, para a padronização e validação da técnica de MLPA, foram utilizadas amostras de DNAs controle positivos (com anormalidades cromossômicas) e negativos (de indivíduos sem alteração), detectadas por outros métodos. Para tanto, foram utilizados DNAs já disponíveis no Departamento de Genética da FCM – Unicamp.

4.1.2. Técnica de MLPA

Para a padronização da técnica de MLPA foi utilizado o *kit* SALSA MLPA P036D-2 HUMAN TELOMERE (Tabela III) e, posteriormente por conta de sua substituição, o *kit* SALSA MLPA P036E-1 HUMAN TELOMERE (Tabela IV) [MRC – Holland, Amsterdã, Holanda; (143)], composto por um par de sondas MLPA de cada uma das regiões subteloméricas dos cromossomos humanos, exceto para os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos.

Tabela III SALSAS MLPA P036-D2 HUMAN TELOMERE-3.

TAMANHO (pb)	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	GENE	SONDA SALSAS MLPA	MAPVIEW
64-70-76-82	Fragmentos controle DQ: visíveis somente quando há menos do que 100 ng de DNA na reação.			
88-92-96	Fragmentos controle DD: fragmentos menores que 88 ou 96 pb indicam desnaturação incompleta.			
106	Fragmento específico para o cromossomo Y.			
118	Fragmento específico para o cromossomo Y.			
130	1p	SCNN1D	6778-L08760	01-001.21 (= 1.21 Mb do telômero)
137	2p	ACP1	2274-L08758	02-000.26
144	3p	CHL1	1721-L01329	03-000.32
151	4p	FLJ20265	2005-L02047	04-000.5
158	5p	PDCD6	1723-L01327	05-000.35
165	6p	IRF4	1724-L02048	06-000.34
172	7p	CENTA1	2275-L02049	07-000.74
179	8p	FBXO25	2397-L01845	08-000.35
186	9p	DMRT1	1727-L02050	09-000.9
194	10p	KIAA0934	2277-L01768	10-000.5
202	11p	RIC-8	3315-L02733	11-000.2
208	12p	SLC6A12	2276-L01767	12-000.18
218	"13p"	PSPC1	2399-L01847	13-019.2 (Acrocêntrico)
226	"14p"	HEI10	1732-L01318	14-019.9 (Acrocêntrico)
234	"15p"	MKRN3	7291-L08858	15-021.36 (Acrocêntrico)
242	16p	POLR3K	1734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	1735-L01315	17-000.20
258	18p	USP14	1736-L02051	18-000.17
266	19p	CDC34	1737-L01313	19-000.48
274	20p	SOX12	2396-L01844	20-000.25
282	"21p"	RBM11	1739-L01311	21-014.50 (Acrocêntrico)
290	"22p"	BID	1740-L01310	22-016.61 (Acrocêntrico)
298	X/Yp	SHOX	1148-L01331	X/Y-000.57 (região PAR)
306	1q	KIAA1720	2392-L02149	01-247.1 (0.2Mb do telômero)
314	2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.26 (1.6Mb do telômero)
322	3q	BDH	2013-L02052	03-198.76 (0.7Mb do telômero)
330	4q	FRG1	7046-L06655	04-191.10 (0.2Mb do telômero)
338	5q	GNB2L1	3319-L02737	05-180.60 (0.2Mb do telômero)
346	6q	PSMB1	1746-L01304	06-170.76 (0.5Mb do telômero)
354	7q	VIPR2	1747-L01303	07-158.36 (0.3Mb do telômero)
362	8q	KIAA0150	1748-L01302	08-144.64 (1.6Mb do telômero)
370	9q	EHMT1	8205-L08170	09-139.83 (0.2Mb do telômero)
378	10q	PAO	9142-L09953	10-135.08 (0.2Mb do telômero)
386	11q	KIAA0056	1751-L01299	11-133.57 (1.2Mb do telômero)
394	12q	ZNF10	2687-L02154	12-132.33 (0.2Mb do telômero)
402	13q	F7	1753-L01297	13-112.81 (1.3Mb do telômero)
410	14q	MTA1	2778-L02201	14-104.99 (1.3Mb do telômero)
418	15q	ALDH1A3	1755-L01295	15-099.26 (1.0Mb do telômero)
426	16q	GAS11 / GAS8	3201-L02669	16-088.62 (0.2Mb do telômero)
434	17q	TBCD	1757-L01293	17-078.4 (0.5Mb do telômero)
442	18q	FLJ21172	1758-L01292	18-075.9 (0.2Mb do telômero)
450	19q	BC-2	9143-L10626	19-063.75 (0.9Mb do telômero)
458	20q	OPRL1	2688-L02884	20-062.19 (0.2Mb do telômero)
466	21q	HMT1	2586-L02059	21-046.9 (0.1Mb do telômero)
474	22q	RABL2B	1762-L08761	22-049.5 (0.1Mb do telômero)
482	X/Yq	SYBL1	1763-L02150	X/Y-154.7 (região PAR; 0.1Mb do telômero)

Tabela IV SALSAS MLPA P036-E1HUMAN TELOMERE-3.

TAMANHO (pb)	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	GENE	SONDA SALSAS MLPA	MAPVIEW
64-70-76-82	Fragmentos controle DQ: visíveis somente quando há menos do que 100 ng de DNA na reação.			
88-92-96	Fragmentos controle DD: fragmentos menores que 88 ou 96 pb indicam desnaturação incompleta.			
100	Fragmento específico para o cromossomo X.			
105	Fragmento específico para o cromossomo Y.			
118	Fragmento específico para o cromossomo Y.			
130	1p	TNFRSF4	2269-L01761	01-001.14
137	2p	ACP1	2274-L08758	02-000.26
144	3p	CHL1	1721-L01329	03-000.32
151	4p	FLJ20265	2005-L02047	04-000.5
158	5p	PDCD6	1723-L01327	05-000.35
165	6p	IRF4	1724-L02048	06-000.34
172	7p	CENTA1	2275-L02049	07-000.74
179	8p	FBXQ25	2397-L01845	08-000.35
186	9p	DMRT1	1727-L02050	09-000.9
194	10p	KIAA0934	2277-L01768	10-000.5
202	11p	RIC-8	3315-L02733	11-000.2
208	12p	SLC6A12	2276-L01767	12-000.18
218	"13p"	PSPC1	2399-L01847	13-019.2 (Acrocêntrico)
226	"14p"	HEI10	1732-L01318	14-019.9 (Acrocêntrico)
234	"15p"	MKRN3	7291-L08858	15-021.36 (Acrocêntrico)
242	16p	POLR3K	1734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	1735-L01315	17-000.20
258	18p	USP14	1736-L02051	18-000.17
266	19p	CDC34	1737-L01313	19-000.48
274	20p	SOX12	2396-L01844	20-000.25
282	"21p"	RBM11	1739-L01311	21-014.50 (Acrocêntrico)
290	"22p"	BID	1740-L01310	22-016.61 (Acrocêntrico)
298	X/Yp	SHOX	1148-L01331	X/Y-000.57 (região PAR)
306	1q	KIAA1720	2392-L02149	01-247.1 (0.2Mb do telômero)
314	2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.26 (1.6Mb do telômero)
322	3q	BDH	2013-L02052	03-198.76 (0.7Mb do telômero)
330	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2,0 Mb do telômero)
338	5q	GNB2L1	3319-L02737	05-180.60 (0.2Mb do telômero)
346	6q	PSMB1	1746-L01304	06-170.76 (0.5Mb do telômero)
354	7q	VIPR2	1747-L01303	07-158.36 (0.3Mb do telômero)
362	8q	KIAA0150	1748-L01302	08-144.64 (1.6Mb do telômero)
370	9q	EHMT1	8205-L08170	09-139.83 (0.2Mb do telômero)
378	10q	PAO	9142-L09953	10-135.08 (0.2Mb do telômero)
386	11q	KIAA0056	1751-L01299	11-133.57 (1.2Mb do telômero)
394	12q	ZNF10	2687-L02154	12-132.33 (0.2Mb do telômero)
402	13q	F7	1753-L01297	13-112.81 (1.3Mb do telômero)
410	14q	MTA1	2778-L02201	14-104.99 (1.3Mb do telômero)
418	15q	ALDH1A3	1755-L01295	15-099.26 (1.0Mb do telômero)
426	16q	GAS11 / GAS8	3201-L02669	16-088.62 (0.2Mb do telômero)
434	17q	TBCD	1757-L01293	17-078.4 (0.5Mb do telômero)
442	18q	FLJ21172	1758-L01292	18-075.9 (0.2Mb do telômero)
450	19q	BC-2	9143-L10626	19-063.75 (0.9Mb do telômero)
458	20q	OPRL1	2688-L02884	20-062.19 (0.2Mb do telômero)
466	21q	HMT1	2586-L02059	21-046.9 (0.1Mb do telômero)
474	22q	RABL2B	1762-L08761	22-049.5 (0.1Mb do telômero)
482	X/Yq	SYBL1	1763-L02150	X/Y-154.7 (região PAR; 0.1Mb do telômero)

O protocolo utilizado encontra-se em conformidade ao descrito por Schouten *et al.* (141), com modificações mínimas.

4.1.2.1. *Desnaturação do DNA e hibridização das sondas*

Cada amostra de DNA utilizada para o experimento foi diluída em TE 1X, na proporção de 150 – 300 ng para 5 µL e mantida em termociclador em temperatura de 98°C por 5 minutos e, posteriormente, a 25°C, foram acrescentados 1,5 µL de SALSA *Probe-mix* e 1,5 µL de *MLPA buffer*. Após ressuspensão, foi mantida a 95°C por 1 minuto e incubada a 60°C durante 16 horas.

4.1.2.2. *Reação de ligação*

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32 µL de *Mix Ligase-65* foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão. Para a obtenção do *Mix Ligase* foram misturados 3 µL de *Ligase-65 buffer A*, 3 µL *Ligase-65 buffer B*, 25 µL de H₂O e 1 µL *Ligase-65*.

Em seguida, cada amostra permaneceu incubada a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

4.1.2.3. *Reação de PCR*

Em novo tubo (para cada amostra) foi acrescentado 4 µL 10X SALSA *PCR buffer*, 26 µL de H₂O, 10 µL da reação de ligação de MLPA e mantido em termociclador a 60°C.

Em seguida, 10 µL de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, podendo assim inicializar a reação de PCR, segundo o protocolo que pode ser observado na Figura 7.

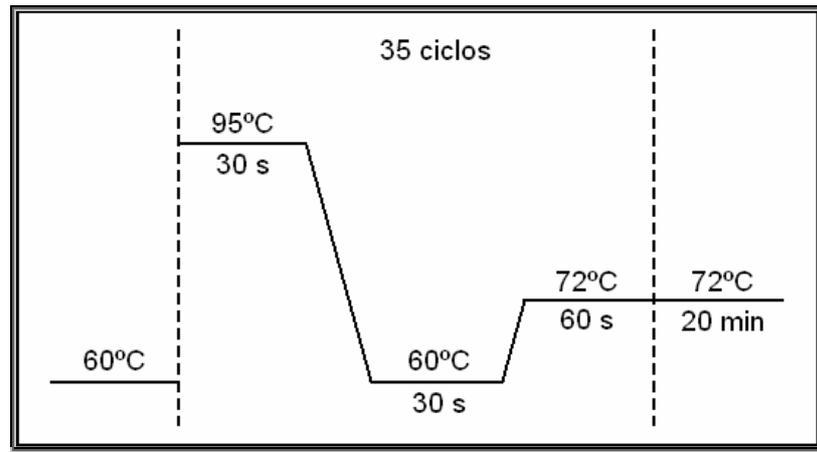


Figura 7 Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos.

Para o *Mix Polymerase* foram necessários 2 μL de SALSA PCR-primers, 2 μL SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5 μL de H_2O e 0,5 μL de SALSA Polymerase.

4.1.2.4. Separação e visualização dos produtos de amplificação

Posteriormente à reação de PCR, foram misturados às amostras 0,75 μL da reação de PCR; 0,75 μL de água deionizada; 0,5 μL de 500ROX e 13,5 μL Formamida Hi-Di, em seguida, desnaturados a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 6 minutos e resfriados em gelo.

Os produtos de PCR foram separados e identificados utilizando o equipamento ABI-PRISM® 310 DNA Analyser (1 capilar) (*Applied Biosystems - Applied Biosystems Corporation*, Estados Unidos), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por *MRC Holland b. v.: Salsa 6-FAM PCR primer-dNTP mix* (143, item, *fragment separation*).

Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados e identificados, utilizando os programas *GeneScan®* e *Genotyper®* (*Applied, Biosystems*), respectivamente.

4.1.2.5. Análise dos dados

Para a análise dos dados foi utilizada a planilha P036C Telomere Adaptive QC, desenvolvida pelo grupo *National Genetics Reference Laboratory*

Manchester (NGRL) e indicada pelo fabricante dos *kits* de MLPA – MRC-Holland, como alternativa ao programa Coffalyser MLPA DAT. Essa planilha é baseada em programa Excel que pode ser usado com a versão 2003+ ou superior do *Microsoft Office version 2003+*. Todos os passos para a normalização dos dados estão incluídos, além de correções para efeitos característicos da maioria das misturas de sondas (decréscimo na altura/área do pico dependente da sonda). Ela pode ser obtida gratuitamente no sítio WEB do grupo Manchester (170) ou mesmo no sítio WEB do fabricante do *kit* (143, *link NGRL, Manchester analysis sheets – free download*).

Tecnicamente, os dados foram normalizados, dividindo-se valores de altura ou área do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela área ou altura do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Na presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores foram, respectivamente, de 0,5 e 1,5, se comparados com a faixa de normalidade estabelecida entre 0,8 – 1,2.

4.2. Seleção dos pacientes para análise

Após a técnica já padronizada, foram investigados rearranjos subteloméricos em 62 indivíduos com atraso global do desenvolvimento ou DM de origem não esclarecida, que estavam sendo atendidos durante o período de execução do projeto, no Ambulatório de Genética Geral II, entre outros, do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da FCM, que funciona no Hospital de Clínicas (HC) – Unicamp.

Todos os pacientes incluídos foram submetidos, anteriormente, a avaliação clínica detalhada com exame de cariótipo, estudo molecular para a SFX (quando pertinente) e outros exames incluídos na rotina de investigação diagnóstica da DM utilizada no serviço, não sendo possível a determinação de uma causa específica. Tais indivíduos ainda foram reavaliados segundo os critérios adaptados de De Vries *et al.* (168), porém a pontuação não influenciou na

seleção dos mesmos. Nesse *checklist* são incluídos os critérios: história familiar de DM, atraso de crescimento pré e pós-natal, dois ou mais sinais faciais dismórficos e um ou mais sinais dismórficos não-faciais ou anormalias congênitas, como apresentado na Tabela V.

Tabela V Critérios para seleção de pacientes com rearranjos teloméricos submicroscópicos [adaptada de De Vries *et al.* (168)].

Dados	Pontuação
História familiar de DM: → Distribuição sugestiva de herança monogênica. → Incompatível com herança monogênica (incluindo fenótipos diferentes).	1 2
Atraso de crescimento pré-natal	2
Anomalias de crescimento pós-natais (para cada uma das seguintes 1 ponto [máx. 2]): → Microcefalia (1), Baixa estatura (1); → Macrocefalia (1), Estatura elevada (1)	2
Dois ou mais dismorfismos faciais → Destaque para hipertelorismo, anomalias nasais e auriculares.	2
Dismorfismos não-faciais e anomalias congênitas (para cada uma 1 ponto [máx.2]): → Destaque para anomalias em mãos (1), cardíacas (1), hipospádia (1), criptorquidia (1).	2

4.2.1. Coleta do material

Durante a consulta com geneticista clínico, após a apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 2), foram coletadas amostras de sangue periférico (aproximadamente 10 mL – 15 mL, em tubos cônicos, contendo 10% do anticoagulante etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O - EDTA 0,5M pH8,0) dos pacientes.

Posteriormente, foi realizada a extração de DNA genômico, pelo método de lise com Proteinase K e extração com fenol/clorofórmio (Boehringer Mannheim, Germany), utilizada no Centro de Genética Molecular e Engenharia Genética/Unicamp (171), com algumas modificações descritas a seguir.

Ao volume de 10 – 15 mL de sangue adicionou-se a Solução A até completar 50 mL e incubou-se a mistura a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado celular (*pellet*) ressuspendido novamente em 20 mL de Solução A para a retirada do excesso de hemácias. Após três lavagens o 'pellet' foi ressuspendido em 1 mL de Solução B diluída para 1x. Acrescentou-se 250 µL de Solução C recém-preparada, contendo Proteinase K. Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 55°C, por 3 horas (Tabela VI).

Tabela VI Reagentes participantes da preparação de soluções utilizadas na extração de DNA.

Solução A	Solução B (estoque 2x):	Solução C (recém-preparada):
[] final	[] final	[] final
MgCl ₂ 5 mM	Na ₂ EDTA 20 mM	Solução B 0,5x
Sacarose 0,32 M	NaCl 20 mM	SDS 5 %
Tris-HCl pH8,0 .. 10 mM	Tris-HCl, pH 8,0 . 20 mM	Proteinase K 1mg/mL
Triton-X 100 1 %		

Para a extração do DNA, adicionou-se 1,25 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (*Applied Biosystems*). Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o qual se centrifugou a 2.500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 seguido de centrifugação, repetindo-se o procedimento duas vezes com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Para a precipitação do DNA, foi acrescentado 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3 M e 2,5x o volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% (para a retirada do excesso de sal) antes de ser ressuspendido em volume, que variou de 200 – 500 µL de TE 1x.

Após a extração, as amostras de DNA genômico foram quantificadas através de leitura de absorbância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *DU-65 Spectrophotometer* (Beckman, Estados Unidos). Para calibração do aparelho foi

utilizada água destilada, como amostra de referência (branco). Após a calibração, 10 µL de cada amostra de DNA foram diluídos em 490 µL de água destilada (fator de diluição = 50), para análise. A concentração das amostras foi obtida a partir da equação:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/mL})] = 50 \times \text{absorbância } 260 \text{ nm} \times \text{fator de diluição},$$

A verificação da integridade do DNA genômico extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) 0,8% em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (172).

A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% de glicose) na razão de 6:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 V e 100 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA ladder de 1 Kb, 1 Kb plus ou 100 pb (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), em concentração de 0,15 µg/µL. Após o tempo de eletroforese o gel foi imerso em solução diluída de brometo de etídio (0,5 µL/mL de água destilada) durante 20 minutos, sendo, posteriormente, visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado, utilizando uma câmera digital acoplada ao microcomputador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS, Kodak Digital Science*, Estados Unidos).

4.2.2. Triagem por MLPA

Após a extração de DNA genômico dos pacientes em estudo foi realizada a triagem pela técnica de MLPA, utilizando o *kit* SALSA MLPA P036D-2 HUMAN TELOMERE e, posteriormente por conta de sua substituição, o *kit* SALSA MLPA P036E-1 HUMAN TELOMERE (MRC – Holland, Amsterdã, Holanda) (143), para a observação de possíveis rearranjos subteloméricos, conforme técnica descrita e posterior padronização. Nesta etapa também foram utilizados DNAs controle sem alteração, como recomenda o fabricante.

4.3. Confirmação dos casos alterados

Os casos positivos detectados por MLPA foram confirmados pela mesma técnica, utilizando-se o *kit* SALSA MLPA P070-A2 HUMAN TELOMERE-5 (Tabela VII) [MRC – Holland, Amsterdã, Holanda (143)], que contém uma sonda para cada região subtelomérica dos cromossomos autossômicos 1 ao 22, além das regiões pseudo-autossômicas dos cromossomos X e Y.

Tabela VII SALSAL MLPA P070-A2 HUMAN TELOMERE-5.

TAMANHO (pb)	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	GENE	SONDA SALSAL MLPA	MAPVIEW
64-70-76-82	Fragmentos controle DQ: visíveis somente quando há menos do que 100 ng de DNA na reação.			
88-92-96	Fragmentos controle DD: fragmentos menores que 88 ou 96 pb indicam desnaturação incompleta.			
100	Fragmento específico para o cromossomo X (gene <i>AMOT</i> ; X-111.95)			
105	Fragmento específico para o cromossomo Y (gene <i>UTY</i> ; Y-013.98).			
118	Fragmento específico para o cromossomo Y (gene <i>DDX3Y</i> ; Y-013.54).			
130	1q	SH3BP5L (KI AA1720)	4084-L03605	01-247.8
137	2q	ATG4B(=APG4B)	2781-L03168	02-242.25
144	3q	KIAA0226	2690-L02842	03-198.88
151	4q	FRG1	2691-L02843	04-191.10
158	5q	GNB2L1	2790-L02232	05-180.60
165	6q	TBP	2694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	2793-L03167	07-158.63
179	8q	RECQL4	2695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	2792-L02846	09-139.78
194	10q	ECHS1	2696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	2697-L02848	11-133.29
210	12q	ZNF10	2686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	2698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	2699-L02850	14-104.99
234	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	2701-L02851	15-100.01
242	16q	GAS8 (=GAS11)	2702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	2703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	2704-L03607	18-075.58
266	19q	BC-2	2705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1 (=FLJ20517)	2706-L00642	20-062.05
282	21q	S100B	2587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	2707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	2708-L02855	X-154.82 + Y-057.68 (PAR region)
306	1p	TNFRSF18	2270-L01762	01-001.13
314	2p	ACP1	2709-L02856	02-000.27
322	3p	CHL1	2896-L02363	03-000.34
330	4p	ZNF141	2779-L02221	04-000.32
338	5p	LOC133957	2791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	4077-L03462	06-000.34
354	7p	UNC84A	2780-L02857	07-000.84
362	8p	FBX025	2715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	2716-L00688	09-000.38
378	10p	ZMYND11 (=BS69)	5180-L02227	10-000.22
386	11p	BET1L	2784-L02226	11-000.20
394	12p	JARID1A (=RBBP2)	2787-L02229	12-000.29
402	"13p"	PSPC1	2717-L03608	13-019.25 (Acrocentric)
410	"14p"	ADPRTL2	2718-L00732	14-019.90 (Acrocentric)
418	"15p"	NDN	4026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
426	16p	DECR2	2720-L00648	16-000.40
434	17p	RPH3AL	4081-L03465	17-000.18
442	18p	THOC1	2789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	3501-L02880	19-000.23
458	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	2723-L00641	20-000.23
466	"21p"	STCH	2724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
474	"22p"	IL17RA	2725-L00660	22-015.96 (Acrocentric)
482	X/Yp (PAR1)	SHOX	3714-L00910	X/Y-000.52 (PAR region)

4.4. Validação dos resultados

4.4.1. Validação pela técnica de sequenciamento

Alterações no gene *SLC6A12* (cromossomo 12p) detectadas em quatro pacientes pela técnica de MLPA com os *kits* SALSA P036D-2 e P036E-1 HUMAN TELOMERE, mas não confirmadas pelo *kit* SALSA MLPA P070-A2 HUMAN TELOMERE-5 [MRC – Holland, Amsterdã, Holanda; (143)] foram validadas pela técnica de sequenciamento automático.

Para tanto, foi construído um par de *primers* para a amplificação da região de interesse do gene *SLC6A12*. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados, a temperatura de anelamento (T_m) e o tamanho do fragmento amplificado (pb) estão representados na Tabela VIII.

Tabela VIII Sequência de *primers* para amplificação do gene *SLC6A12*.

Primers 5' → 3'	T_m (°C)	Tamanho (pb)
<i>SLC6A12</i> sense – ACTTCACAAACACTCGGCATG	57,2	426
antisense – TCCTCACCCACCTCCAACAGAG		

Para a amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada a técnica de PCR, a partir do seguinte protocolo (Figura 8):

- ▶ 20,3 μ L H₂O deionizada
- ▶ 3,0 μ L Tampão (10X) (Invitrogen)
- ▶ 0,7 μ L MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen)
- ▶ 2,5 μ L dNTP (2 μ M) (Invitrogen)
- ▶ 1,0 μ L *primer* direto (20 pmoles)
- ▶ 1,0 μ L *primer* reverso (20 pmoles)
- ▶ 0,3 μ L BSA 1%
- ▶ 0,2 μ L enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/ μ L) (Invitrogen)
- ▶ 1,0 μ L DNA genômico (200-500 ng) em 30,0 μ L de reação de PCR

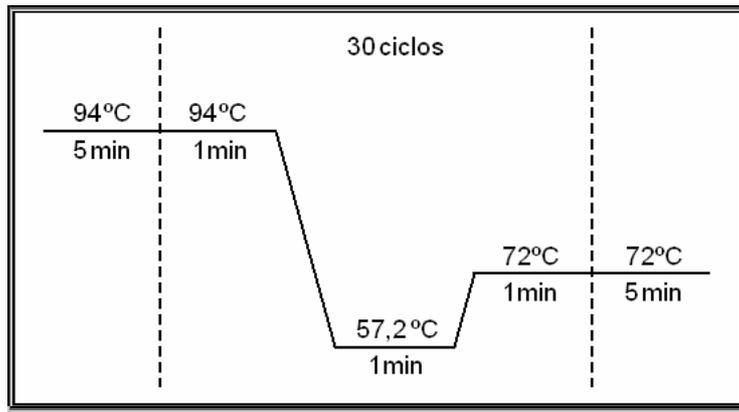


Figura 8 Ciclos utilizados na amplificação da região de interesse do gene *SLC6A12*.

A verificação do produto de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (*Invitrogen Corporation*, Estados Unidos) 1,0% em TBE 1x. A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% de glicose) na razão de 6:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 V e 100 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA ladder de 1 Kb, 1 Kb plus ou 100 pb (*Invitrogen Corporation*, Estados Unidos), em concentração de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após o tempo de eletroforese o gel foi imerso em solução diluída de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de água destilada) durante 20 minutos, sendo, posteriormente, visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado, utilizando uma câmera digital acoplada ao microcomputador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS*, *Kodak Digital Science*, Estados Unidos).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *kit ABI-PRISM Big Dye® Terminator Cycle v3.1 Sequencing Kit* (*Applied Biosystems-Applera Corporation*, Estados Unidos) e os componentes e volumes da reação foram os seguintes (Figura 9):

- ▶ 4,0 μL H₂O deionizada
- ▶ 2,0 μL Tampão Big Dye 5X
- ▶ 2,0 μL Big Dye®
- ▶ 1,0 μL Primer (direto ou reverso) (5 pmoles)
- ▶ 1,0 μL produto de PCR

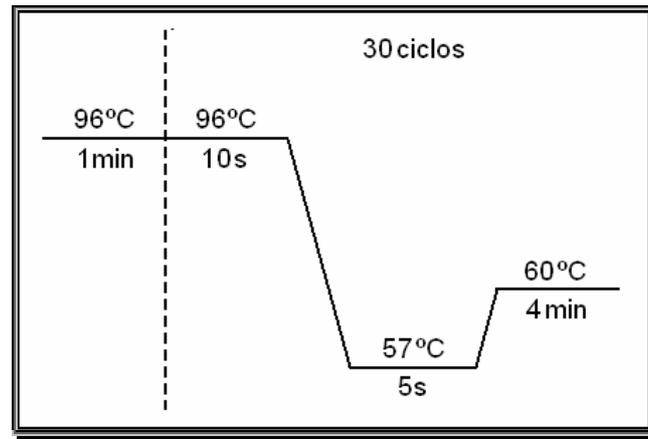


Figura 9 Ciclos utilizados nas reações de sequenciamento automático.

Após a reação de sequenciamento as amostras foram purificadas com o intuito de remover o DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes. Para tanto, as amostras foram precipitadas com 80 μ L de etanol gelado a 80% e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 45 minutos a 3700 rpm, após o que o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 150 μ L de etanol gelado a 70%. Posteriormente uma nova centrifugação foi realizada, desta vez por 10 minutos a 3700 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras, armazenadas a -20°C.

O produto da reação de sequenciamento purificado foi ressuspendido em 10 μ L de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems-Applera Corporation*, Estados Unidos), sendo vigorosamente agitado e em seguida, desnaturado a 94°C por 5 minutos.

Posteriormente, as reações de sequenciamento foram submetidas à eletroforese capilar, utilizando o sequenciador ABI-PRISM® 3700 DNA Analyser (96 capilares) (*Applied Biosystems-Applera Corporation*, Estados Unidos). As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais do gene com o auxílio dos programas Chromas Lite® (173) para visualização do eletroferograma e Gene Runner® v3.01 (174) para confirmação das sequências obtidas com a sequência padrão do gene.

4.4.2. Validação pela técnica de FISH

As alterações detectadas pela técnica de MLPA com os *kits* SALSA P036 HUMAN TELOMERE, confirmadas pelo *kit* SALSA MLPA P070 HUMAN TELOMERE-5 [MRC – Holland, Amsterdã, Holanda (143)], foram validadas pela técnica FISH. Para tanto, foram realizadas culturas de linfócitos, a partir de sangue periférico coletado do indivíduo, e seus genitores quando pertinente, segundo a técnica rotineiramente utilizada no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP (175).

As células permaneceram estocadas em solução de metanol e ácido acético na proporção 3:1 a -20°C e posteriormente utilizadas para preparação das lâminas.

A técnica foi desenvolvida segundo protocolo modificado de Pinkel *et al.* (176). Para investigação das amostras foram utilizadas sondas do tipo locus-específica para a região sutelomérica indicada a partir dos resultados alterados detectados pela técnica de MLPA (Aquarius® Cytocell®).

Após a preparação das lâminas, as mesmas foram deixadas em estufa a 37°C *overnight* e em seguida analisadas em microscópio de contraste de fase para a seleção da área onde seria aplicada a sonda. A área delimitada foi marcada com o uso de uma caneta diamante.

As lâminas foram colocadas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0) a 37°C (+/- 1°C) durante 20 a 60 minutos, posteriormente desidratadas em uma série de etanóis a 70%, 85% e 100% por 2 minutos cada e deixadas em temperatura ambiente para secar.

As sondas utilizadas foram preparadas ficando, inicialmente, em temperatura ambiente por alguns minutos. Em seguida, para hibridizações com uma única sonda misturou-se 3 µL da sonda com 7 µL do tampão de hibridização. Já para hibridizações com duas sondas, misturou-se 3 µL de cada sonda com 4 µL do tampão de hibridização.

Para a etapa de pré-desnaturação, as lâminas e as sondas foram pré-aquecidas por 5 minutos a 37°C; em seguida aplicou-se 10 µl da sonda na área

delimitada da lâmina, cobriu-se com lamínula de no máximo 22x22 mm, selando com cola especial.

A desnaturação foi feita colocando-se as lâminas em uma placa aquecida a 75°C (+/- 1°C) por 2 minutos. Posteriormente, as mesmas foram acondicionadas em uma caixa úmida e escura e colocadas em estufa a 37°C (+/- 1°C) *overnight*.

Ao final desse tempo, as lamínulas e a cola especial foram retiradas cuidadosamente e as lâminas colocadas em 0,4x SSC a 72°C (+/- 1°C) (pH 7,0) por 2 minutos e em uma solução de 2x SSC/0,05% Tween-20 (pH 7,0) em temperatura ambiente por 30 segundos.

Em seguida, 10 µL do contracorante DAPI foi aplicado sobre a área selecionada, posteriormente coberta com lamínula, e após 10 minutos, a visualização dos cromossomos foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51-BF-II / BX2[®]) e as imagens fotografadas com o sistema de análise FISHView (Applied Spectral Imaging[®]).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido às dificuldades surgidas e às alternativas encontradas, principalmente com relação à calibração do aparelho e à padronização da técnica de MLPA, optou-se por apresentar os itens Resultados e Discussão juntos, a fim de facilitar o entendimento do texto.

5.1. Calibração do equipamento ABI-PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied, Biosystems – Applied Biosystems, Estados Unidos)

Após revisão bibliográfica para identificar as melhores alternativas de desenvolvimento da técnica de MLPA, levando em conta a infra-estrutura da instituição, foi necessária a calibração do aparelho de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310 (*Applied Biosystems - Applied Biosystems, Estados Unidos*) para o método de genotipagem.

Para tanto, foi instalado no microcomputador vinculado ao equipamento o programa de análise GeneScan® (*Applied Biosystems - Applied Biosystems, Estados Unidos*) para a construção dos arquivos de corridas e posterior análise das mesmas. O equipamento ABI-PRISM® 310 foi calibrado, com a instalação de um capilar de 47 cm x 50 µm, utilizando polímero POP-4™ e tampão de corrida com EDTA 10X™ (específicos para genotipagem), esse último diluído a 10:1 com água destilada e autoclavada (177).

Durante a eletroforese capilar realizada no equipamento ABI-PRISM® 310, a reação de MLPA é coletada do tubo para o capilar e, em sua passagem pelo laser, que excita os fluoróforos presentes nos fragmentos resultantes da reação, produz fluorescência. Tal fluorescência é detectada pela câmara CCD (Charge-Coupled Device) e seu sinal identificado sob a forma de picos pelo programa GeneScan®. Assim, cada um dos tipos de fluoróforos emite sua fluorescência máxima em um comprimento de onda diferente (Figura 10). Durante a coleta dos dados nos equipamentos ABI-PRISM®, os sinais fluorescentes são separados por um gradiente de difração de acordo com os seus comprimentos de

onda, e projetados na câmara CCD em um padrão de espaçamento previamente definido. O fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluorescina; $C_{21}H_{12}O_7$) emite o menor comprimento de onda e é identificado como azul, seguido pelos fluoróforos HEX (verde), NED (amarelo), ROX (vermelho) e LIZ (laranja) (177).

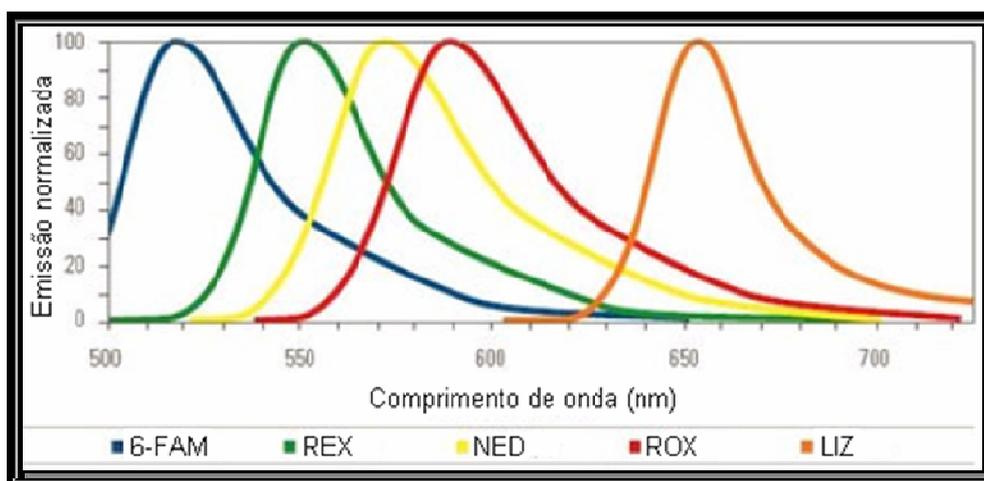


Figura 10 Emissão espectral dos cinco tipos de fluorescência utilizados no equipamento de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310.

Apesar de esses fluoróforos emitirem suas fluorescências máximas em diferentes comprimentos de onda, pode existir sobreposição no espectro de emissão de cada um deles, que deve ser corrigida por uma matriz de genotipagem. Tal matriz contém as informações necessárias para o programa corrigir o espectro de cores no filtro virtual. Uma vez construído, o arquivo de matriz pode ser utilizado para a análise de corridas que sejam realizadas no mesmo equipamento, com mesmo filtro virtual e câmara CCD; façam parte do mesmo tipo de análise para qual ela foi construída (genotipagem); utilizem o mesmo polímero, condições de corrida e padrão de cores (177).

Sendo assim, para a calibração espectral, foi construída uma matriz de genotipagem, utilizando os padrões de matriz 6-FAM, HEX, NED e ROX, respectivamente nas cores azul, verde, amarela e vermelha, específicos para o filtro virtual D. A escolha desse filtro, bem como dos padrões, foi baseada no fato de as sondas existentes no *kit* de MLPA serem marcadas com o fluoróforo SALSA 6-FAM (177,143).

Com relação ao padrão de peso molecular, essencial para a precisão na identificação dos tamanhos dos fragmentos visualizados na eletroforese capilar, foi escolhido o GeneScan® 500-ROX (*Applied Biosystems - Applied Corporation*, Estados Unidos), capaz de identificar fragmentos cujos tamanhos variam de 35 pb a 500 pb (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb), existente nos fragmentos resultantes da reação de MLPA (177,143).

Quanto às condições de corrida das reações no equipamento ABI-PRISM® 310, as especificações foram: 180 segundos de pré-corrida; 1 segundo de tempo de espera; 20 segundos de tempo de injeção para captura da amostra a uma voltagem de 3,0 kV; 30 min de corrida, a uma voltagem de 15 kV e temperatura de 60°C; e volume de preenchimento do capilar de 184 vezes (177).

Precedendo cada bateria de corridas no equipamento, foi necessário realizar um teste ccd-4 cores, para conferir se os quatro padrões (amarelo, azul, verde e vermelho) estavam segregando paralelamente, sem interferência de um em outro, o que poderia acarretar em artefato de técnica, prejudicando a análise dos fragmentos da reação. Caso a segregação dos quatro padrões fosse muito próxima, a ponto de impedir sua distinção, seria aconselhável uma limpeza externa do capilar, de preferência com papel embebido em etanol 70% (Figuras 11 e 12) (177).

Para a limpeza interna no capilar foi indicado que, a cada início e término de ensaio de corridas, o capilar fosse preenchido com água deionizada e em seguida com polímero POP-4™, para assegurar que o mesmo estivesse completamente livre de contaminantes que pudessem aderir ao capilar e, conseqüentemente, alterar a leitura dos picos de fragmentos pelo *laser* do equipamento em corridas futuras (177,143).

Quanto ao prazo de validade do polímero POP-4™, bem como do tampão com EDTA 10X™, utilizados para a corrida das amostras, o fabricante aconselha a troca a cada dois dias. Entretanto, após os primeiros ensaios da técnica, foi percebido que ambos (polímero e tampão) funcionam corretamente em

um período maior que o aconselhado pela empresa, sendo o tempo próximo de duas semanas para o polímero e uma semana para o tampão (177).

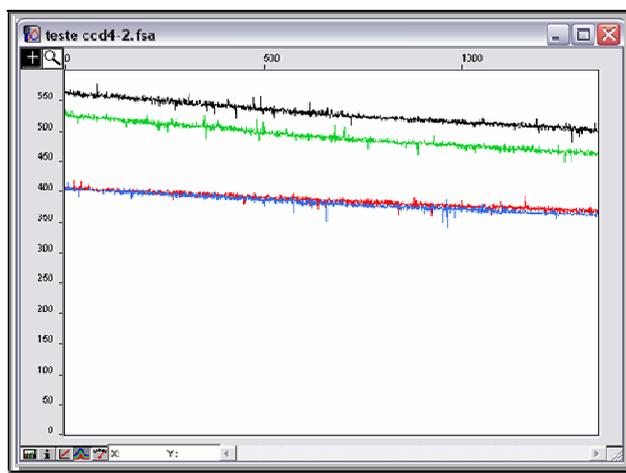


Figura 11 Exemplo de teste ccd-4 cores rejeitado, mostrando os padrões 6-FAM e ROX interferindo um em outro, obtido durante a construção da matriz de genotipagem para o equipamento ABI-PRISM® 310.

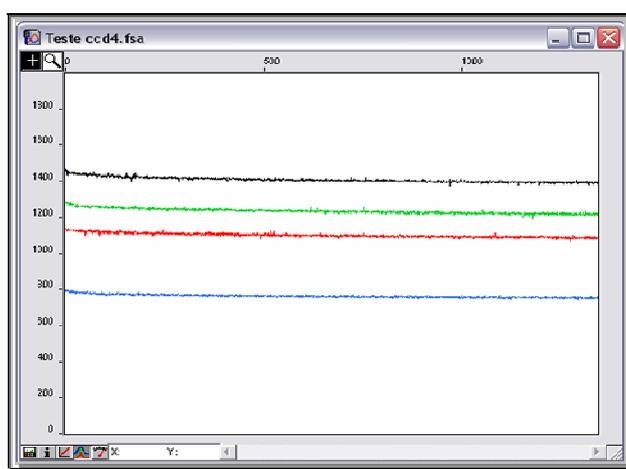


Figura 12 Exemplo de teste ccd-4 cores aceito, após a limpeza do capilar, ilustrando a segregação paralela dos padrões, sem interferência de um em outro.

Com relação ao capilar, o fabricante recomenda a troca após 100 corridas. Porém, dada a calibração feita no aparelho de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310, foi possível estender o número de corridas geradas no equipamento para um número próximo do triplo do aconselhado, sem o risco de alteração dos resultados (177).

5.2. Padronização da técnica de MLPA - kit P036-D2 e kit P036-E1 HUMAN TELOMERE-3.

Com a finalização da etapa de calibração do aparelho ABI-PRISM® 310 para reações de genotipagem foi possível dar início à padronização da técnica de MLPA, por meio do *kit* P036-D2 HUMAN TELOMERE-3, e posteriormente, devido à substituição do mesmo, com o *kit* P036-E1, que permite a identificação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com DM.

A dificuldade em observar ou dispor de dados de outros estudos que pudessem fornecer subsídios para a otimização da técnica e sua adequação a diferentes equipamentos, nos levou a optar pelo uso dos protocolos elaborados pelo fabricante, enfatizando a análise dos seis aspectos abaixo relacionados, e detalhados a seguir:

-
- 1. Validação da técnica utilizando controles com e sem alteração;*
 - 2. Tempo de estocagem dos produtos de reação em refrigerador;*
 - 3. Possibilidade de diminuição do protocolo, para 1/2 ou 2/3 do recomendado pelo fabricante;*
 - 4. Quantidade de DNA utilizado na reação;*
 - 5. Plataforma de análise;*
 - 6. Elaboração de um protocolo detalhado, com todos os passos da técnica, já ajustada à infra-estrutura da instituição.*
-

5.2.1. Validação da técnica utilizando controles negativos e com alteração

O *kit* P036-D2 TELOMERE-3 possui 46 sondas, cada uma específica para cada região subtelomérica de todos os cromossomos humanos não acrocêntricos. Para esses últimos, nas regiões 13p, 14p, 15p, 21p e 22p, é incluída uma segunda sonda, presente no braço q, próximo ao centrômero. Os diferentes produtos de amplificação dessas sondas contêm entre 130 e 482 pb (Tabela III, pág 57). Além disso, o *kit* inclui nove fragmentos controle com produtos

de amplificação menores do que 120 pb: quatro fragmentos específicos para a análise da quantidade de DNA (DQ) com 64, 70, 76 e 82 pb; três para desnaturação de DNA (DD) com 88, 92 e 96 pb e dois fragmentos específicos para o cromossomo Y, com 106 e 118 pb (Tabela III, pág 57) (143).

O objetivo da inclusão de fragmentos DQ é fornecer um sinal claro de que a quantidade de DNA utilizado na amostra é menor do que os 20 ng necessários para a obtenção de resultados confiáveis. É importante destacar que a amplificação dos produtos dos fragmentos DQ é visível somente quando a quantidade de DNA é relativamente pequena, já que a ligação com as sondas do *kit* não ocorre. Entretanto, quando a quantidade de DNA utilizado ultrapassa 100 ng, a amplificação dos quatro fragmentos controle DQ (de 64 a 82 pb) é quase imperceptível (143).

Já os fragmentos DD, representados por duas sondas de oligonucleotídeos sintéticos, possuem a função de sinalizar quando o DNA não foi desnaturado completamente, sendo o tamanho dos produtos de sua amplificação similares aos das outras sondas do *kit* (143).

Para reações cujo DNA utilizado pertence a indivíduos do sexo masculino, os fragmentos específicos para o cromossomo Y são indicadores de que houve reação. Por esse motivo, para a validação da técnica, foi utilizado DNA de homens normais (sem DM). Além disso, a visualização da amplificação desses fragmentos exclui a possibilidade de troca acidental de amostra (do sexo masculino por outra do sexo feminino), para os casos de reação do sexo feminino (143).

Como a técnica de MLPA se baseia na análise de mudanças relativas à amplificação das sondas, é inviável estimar as alterações com relação ao número de cópias de uma amostra, sem os dados de uma reação referência para comparação. De um modo geral, reações do tipo referência correspondem a amostras de DNA obtidas de indivíduos normais (controles sem alteração), sendo recomendada a utilização de três a sete controles sem alteração por ensaio de MLPA, a fim de estimar a reprodutibilidade de cada sonda dentro do experimento, conforme as planilhas de análise para os *kits* (143).

Dessa forma, para a validação do *kit* P036-D2 inicialmente foram incluídos nove controles sem alteração, do sexo masculino, sendo as amostras preparadas segundo a técnica detalhada a seguir. O número de nove controles foi estimado com o objetivo de se formar um pequeno grupo de controles já padronizados, que posteriormente seriam utilizados no estudo envolvendo pacientes com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática.

Segundo o fabricante, é recomendável o uso de amostras de controles sem alteração derivadas do mesmo tipo de tecido (nesse caso sangue periférico) e extraídas a partir de um mesmo método que as amostras-testes, a fim de minimizar diferenças e variações não-biológicas (143).

O método de extração de DNA genômico utilizado foi o baseado em fenol-clorofórmio e purificação com Proteinase-K, recomendado pelo fabricante para a técnica de MLPA, pois permite a obtenção de DNA de melhor qualidade e seu custo é baixo se comparado com outros métodos de extração (143).

Inicialmente, a concentração de DNA dos controles foi determinada por um espectrofotômetro, com leitura de absorbância a 260 nm, sendo a integridade do DNA testada em de gel de agarose 0,8% em TBE 1X. Em seguida, as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de 50 – 100 ng/μL, em um volume de 50 μL para a realização da técnica, de modo que quantidade final de DNA utilizada no experimento fosse de 150 – 300 ng em 5 μL.

Ao término da técnica, mais precisamente da fase de PCR, as reações foram preparadas para a leitura no equipamento de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310, seguindo a proporção de 13,5 μL de formamida Hi-Di; 0,75 μL do produto de reação; 0,75 μL de água deionizada e 0,5 μL de padrão de peso molecular ROX-500™, desnaturados à temperatura de 95°C por 6 minutos e, em seguida, resfriados em gelo até a colocação no aparelho de eletroforese capilar ABI-PRISM® 310.

A corrida das reações no equipamento ABI-PRISM® 310 seguiu as especificações determinadas na calibração do aparelho, sendo os resultados analisados com o programa GeneScan®, por meio da matriz construída também quando da calibração do equipamento; e com programa Genotyper®, a fim de se

obter a identificação exata dos fragmentos, bem como de dados como tamanho e altura dos mesmos.

Apesar de ser possível trabalhar com dados de altura ou área dos picos referentes à amplificação dos fragmentos na reação, para kits como o P036 as sondas de maior tamanho (400 pb) passariam mais lentamente pelo *laser* do aparelho de eletroforese capilar, possibilitando a identificação, pelo programa GeneScan®, de metade da área ao invés de sua totalidade, referente à amplificação da sonda, como mostrado na Figura 13. Assim, para evitar resultados discordantes e não reais, o parâmetro altura foi escolhido para a normalização dos dados.

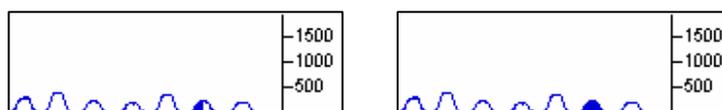


Figura 13 Possíveis diferenças encontradas quando se trabalha com parâmetros de área, para leitura de amplificação de sondas de tamanho grande. Em A, no detalhe é observada metade da área sendo reconhecida para tal fragmento (valor incorreto). Em B, no detalhe, a correspondência certa para o parâmetro de área.

Comparando-se os valores de altura dos picos de cada reação, obtidos por meio dos programas GeneScan® e Genotyper®, foi possível analisar as amostras na planilha específica P036C Telomere Adaptive QC do grupo NGRL-MANCHESTER.

Pelos parâmetros de análise da planilha P036C Telomere Adaptive QC, do grupo NGRL-MANCHESTER, valores inseridos dentre 0,85 – 1,15 são considerados normais. Já deleção e duplicação são atribuídos a valores entre 0,35 - 0,65 e 1,35 – 1,65, respectivamente. Para valores nas faixas de 0,65 – 0,85 e 1,15 – 1,35, considerados dentro uma margem duvidosa, é necessária repetição do experimento (170).

Neste estudo, porém, a partir da padronização da técnica, segundo a análise de reações anteriores, percebeu-se que a faixa considerada duvidosa poderia ser suprimida, sem alteração na interpretação dos resultados, uma vez que os valores considerados alterados permaneciam sempre na faixa específica

para os mesmos. Assim, com o intuito de simplificar a análise, foi feita uma adaptação nesses intervalos, sendo considerada faixa de normalidade entre 0,75 – 1,25; de deleção entre 0,35 -0,75 e de duplicação entre 1,25 – 1,65.

Com a análise dos resultados das reações dos nove controles sem alteração observou-se que a amplificação das sondas está dentro da faixa de normalidade, condizente com o esperado para esses indivíduos (Figuras 14 e 15, Ca). Em posse desses resultados foi realizado um novo ensaio, envolvendo os mesmos controles sem alteração, com o objetivo de confirmar os resultados encontrados e estabelecer a primeira etapa da padronização.

Após esse ensaio confirmatório, as reações foram analisadas, sendo um dos resultados apresentado nas Figuras 14 e 15 (Cb). Com a comparação dos resultados a partir dos gráficos representativos de cada reação, constatou-se que o resultado da primeira série de reações (Ca) não foi o mesmo encontrado na confirmação (Cb), sendo detectadas aparentes deleção e duplicações nesses controles, não havendo confirmação dos resultados do primeiro experimento.

Na busca de explicações para esse tipo de discrepância, foi verificado que o fabricante adverte quanto ao tempo de armazenamento das amostras, informando que as mesmas não devem ser armazenadas por longos períodos a 4°C, pois mesmo nessa temperatura pode haver proliferação de microorganismos e conseqüente deterioração das amostras. Além disso, como mencionado anteriormente, é aconselhável que sejam utilizadas amostras oriundas de um mesmo tecido e extraídas pelo mesmo método, de preferência em épocas próximas, a fim de minimizar variações causadas por possíveis contaminantes (143).

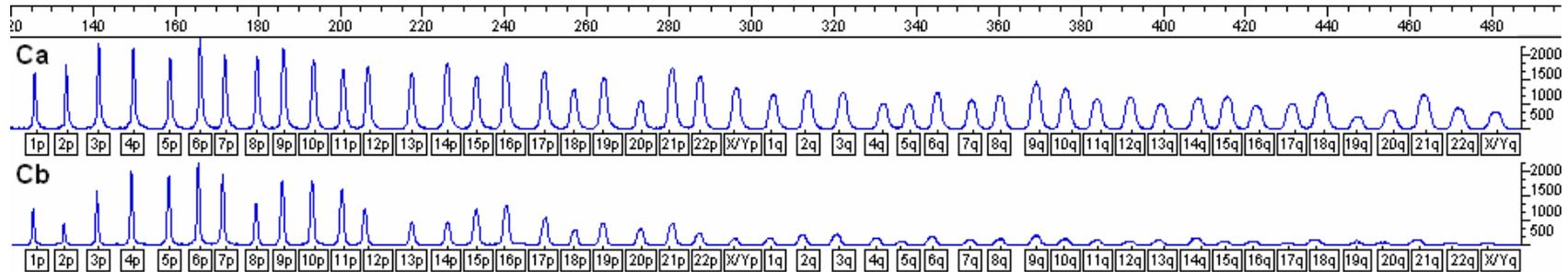


Figura 14 Gráfico de uma reação-contrôle no primeiro experimento (Ca) e no experimento de confirmação (Cb), da primeira etapa de padronização, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos*).

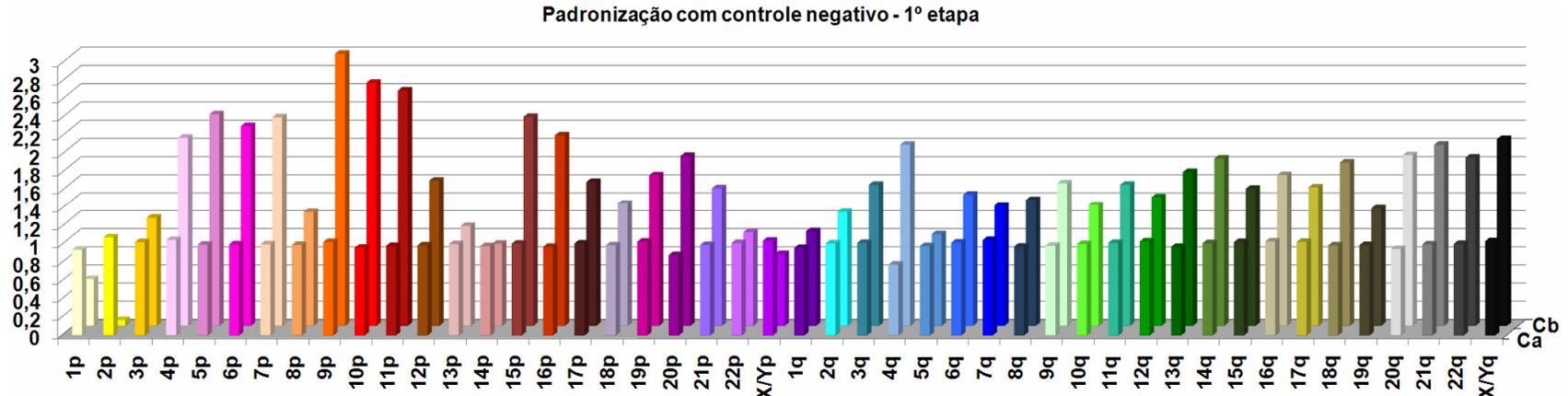


Figura 15 Gráfico de uma reação-contrôle no primeiro experimento (Ca) e no experimento de confirmação (Cb), da primeira etapa de padronização, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

No intuito de explicar os resultados anômalos, foi cogitado se as amostras de DNA utilizadas nesses dois ensaios não estariam degradadas o suficiente de modo a não permitir a confirmação dos resultados, apesar de essa suposta degradação não ser evidenciada no teste em gel de agarose 0,8%, realizado antes do procedimento. Outra hipótese seria o fato de a extração das amostras ter ocorrido em datas muito diferentes ou ainda a de armazenamento inadequado.

Diante disso, entre as nove amostras anteriores, foram selecionadas cinco (cuja data de extração estava mais próxima) para um novo experimento, sendo observados resultados mais uniformes entre as reações (Figuras 16 e 17 Cc).

Seguindo a padronização proposta, foram realizados os testes de confirmação dessas amostras. Pela análise observaram-se valores mais uniformes, tanto em uma mesma reação, como entre as reações (Figuras 16 e 17 Cd), provavelmente pelo fato das amostras de DNA terem o mesmo tempo de coleta e extração, bem como as mesmas condições de armazenamento. Isso confirmaria então a hipótese que o resultado das reações obtidas pelo *kit* P036-D é influenciado pelo tempo e as condições de armazenamento das amostras (143).

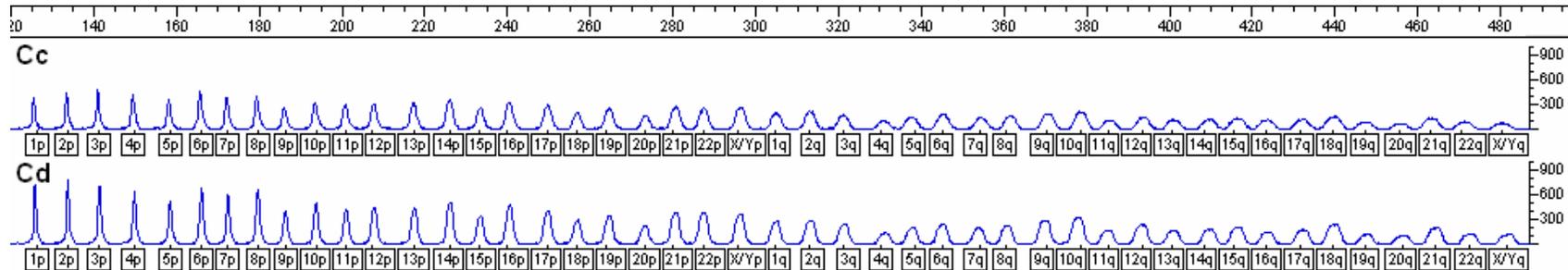


Figura 16 Gráfico de uma reação-contrôle no primeiro experimento (Cc) e no experimento de confirmação (Cd), da segunda etapa de padronização, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos*).

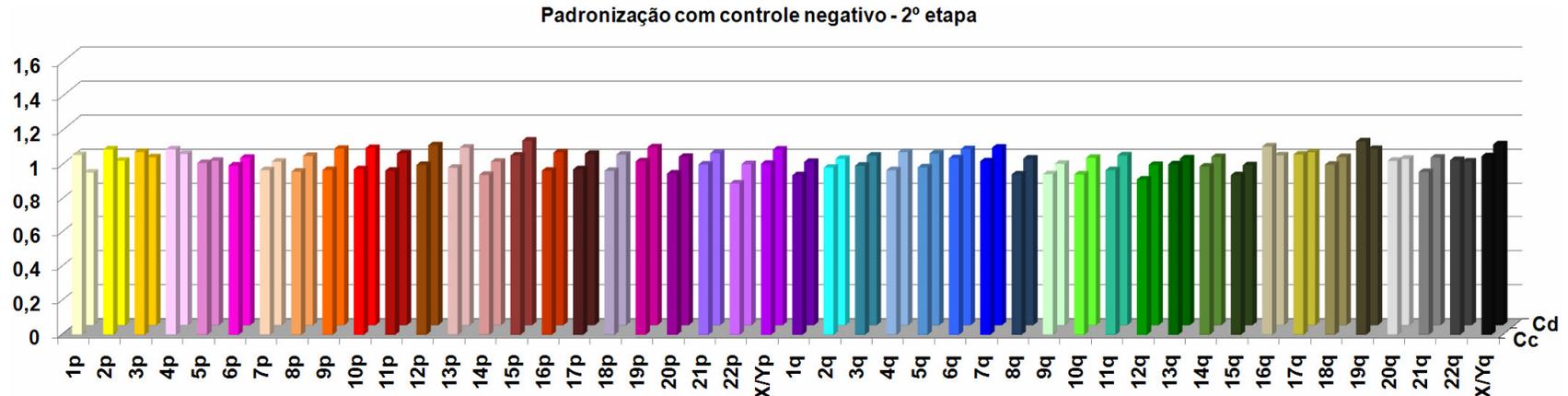


Figura 17 Gráfico de uma reação-contrôle no primeiro experimento (Cc) e no experimento de confirmação (Cd), da segunda etapa de padronização, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

Pelo resultado anterior, cinco controles sem alteração estavam disponíveis para os experimentos de MLPA. Porém, uma vez que a cada ensaio são necessários mais de seis controles normais, optou-se por descartar as amostras anteriores e realizar uma nova coleta. Assim, foram obtidos 11 controles masculinos sem alteração, de forma que desse prosseguimento com a padronização. Além disso, a partir dessas novas amostras foi possível a formação de um pequeno banco de amostras de DNA sem alteração para o estudo com pacientes.

Para esses novos controles, foram realizados dois experimentos: um inicial e outro confirmatório, conforme descrito anteriormente. O resultado para esse novo grupo, em ambos os ensaios, foi similar ao da etapa anterior (Figura 16 e 17), confirmando a hipótese de que em amostras extraídas por um mesmo método e em datas próximas são reduzidas as diferenças não biológicas e as variações estruturais (143).

Além dos controles normais, a inclusão de controles com alterações identificadas por outros métodos é igualmente importante na padronização do *kit* P036D-2. Sendo assim, para a padronização com controles alterados também foram selecionadas amostras de material genômico de dois indivíduos, um deles (C+1) (Figura 18 e 19) apresentando uma deleção terminal do braço longo do cromossomo 18 [del(18)(q22->qter)] e o outro (C+2) (Figura 20 e 21) com uma translocação envolvendo os cromossomos 3 e 10 [der(3)t(3;10)(p26;p11)].

Para a padronização do *kit* P036-D no caso dos controles com alteração, também foram realizados dois ensaios, um inicial e outro confirmatório. Após a eletroforese capilar e análise, os dados de altura foram inseridos na planilha específica e comparados em relação os mesmos dados de amostras controle sem alteração (R).

As figuras 18 a 21 mostram os resultados encontrados para esses dois indivíduos.

A análise dos gráficos mostra que em relação aos controles positivos, as anormalidades antes detectadas por outro método foram confirmadas pela técnica de MLPA. No caso do controle positivo C+1, além da alteração antes

determinada, foram observadas duas novas anormalidades, uma considerada como polimorfismo [del(4q)], já relatada nos protocolos de MLPA para o *kit* e lote em questão (143) e também em diversos estudos (46,167,95,178), além de uma duplicação da região “14p”, que na realidade se refere a uma sonda proximal localizada no braço longo do cromossomo 14, ou 14q proximal. Para a conclusão desse caso e orientação adequada à família, é aconselhável a validação desse novo resultado pela técnica de FISH e estudos dos genitores. Já quanto ao controle positivo C+2 as alterações encontradas anteriormente, uma deleção 3p terminal e uma duplicação 10p terminal, foram corroboradas com a técnica de MLPA, confirmando a sua especificidade e eficácia.

Na repetição dos testes para confirmar os resultados obtidos, a análise nos programas GeneScan®, Genotyper® e planilha P036C DQ adaptive mostrou resultados compatíveis com os observados no ensaio inicial.

Dessa forma, a etapa de validação da técnica de MPLA utilizando controles do sexo masculino sem alteração e controles alterados foi considerada concluída e satisfatória.

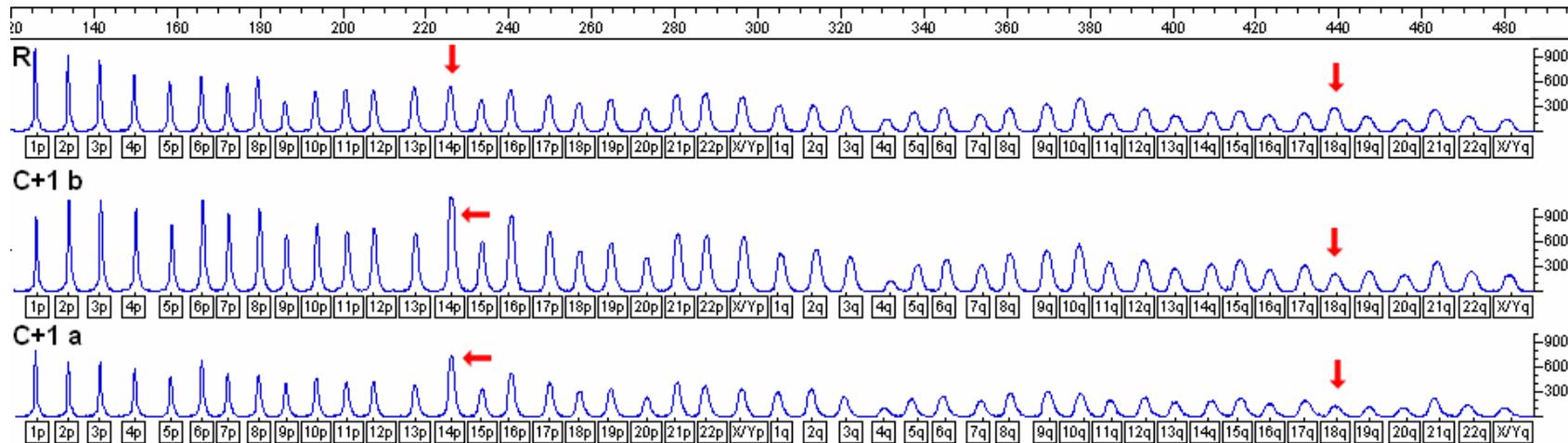


Figura 18 Gráfico de reação-controlado alterado no primeiro experimento (C+1a) e no experimento de confirmação (C+1b), da etapa de padronização com controles alterados, segundo o programa Genotyper® (Applied Biosystems - Applied Biosystems, Estados Unidos).

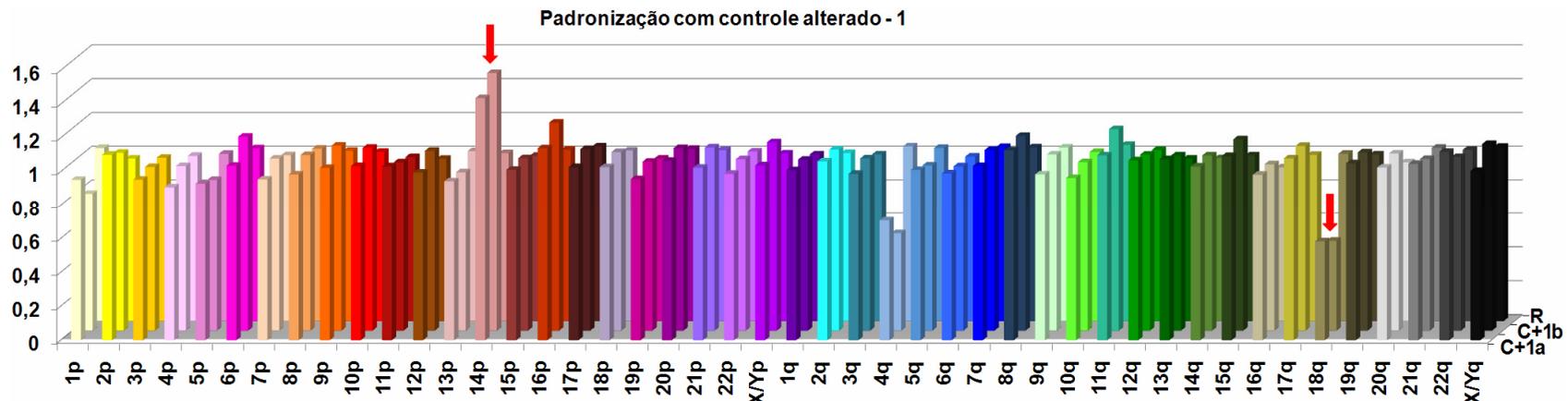


Figura 19 Gráfico de reação-controlado alterado no primeiro experimento (C+1a) e no experimento de confirmação (C+1b), da etapa de padronização com controles alterados, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

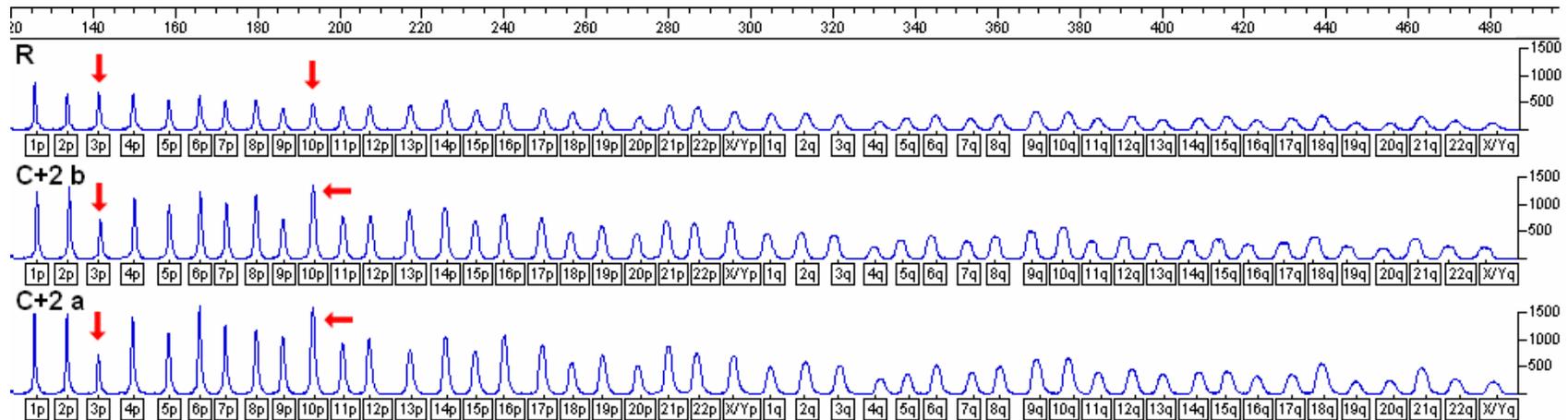


Figura 20 Gráfico de reação-controlado alterado no primeiro experimento (C+2a) e no experimento de confirmação (C+2b) da etapa de padronização com controles alterados, segundo o programa Genotyper® (Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos).

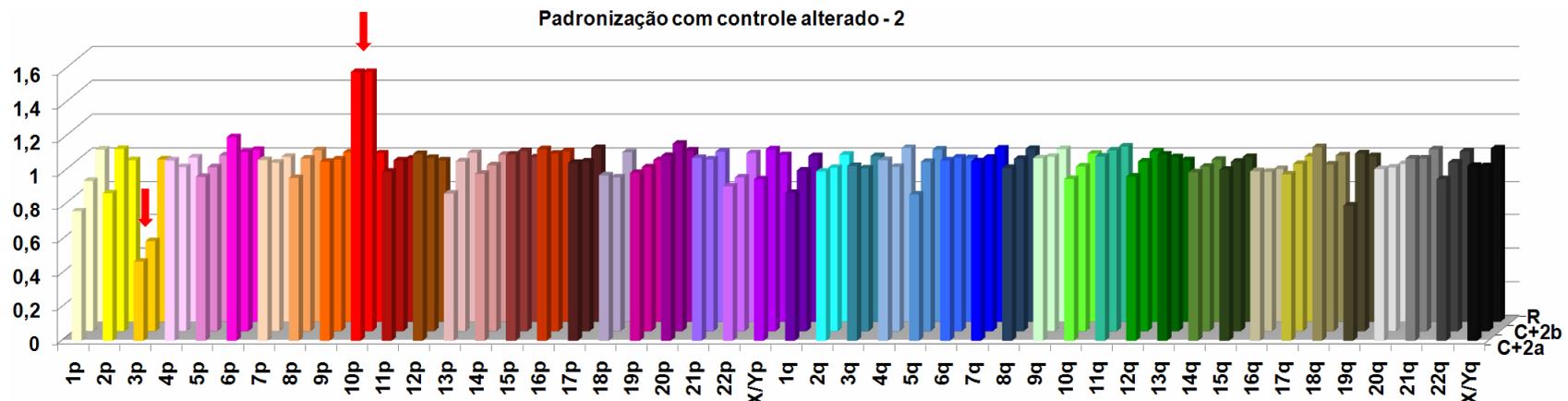


Figura 21 Gráfico de reação-controlado alterado no primeiro experimento (C+2a) e no experimento de confirmação (C+2b), da etapa de padronização com controles alterados, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

5.2.2. Tempo de estocagem dos produtos de reação em refrigerador.

Segundo o protocolo do fabricante, os produtos de reação da técnica de MLPA, incluindo os utilizados nas etapas de hibridização e PCR, podem ser armazenados sob refrigeração pelo período aproximado de uma semana, aproximadamente, devido a presença de fragmentos com fluorescência, que sofrem processo de degradação rápida, por conta do tempo de meia-vida de seus fluoróforos (143).

Porém, pela possibilidade de imprevistos, tais como a necessidade de repetição da eletroforese capilar para conclusão do caso, ou mesmo um armazenamento maior da reação por ocasião de manutenção do equipamento de eletroforese, considerou-se necessário observar por quanto tempo as reações de MLPA podem ser armazenadas sob refrigeração sem prejuízo dos resultados. Diante disso, a estratégia adotada para se estimar o tempo máximo de estocagem dos produtos foi a repetição semanal da eletroforese capilar de cinco reações controle e, em seguida, a análise das mesmas nos programas GeneScan®, Genotyper® e planilha P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

Foram realizadas 10 repetições (R1 a R10), sendo R0 a data em que foi feita a reação, totalizando um período de aproximadamente três meses, uma vez que a partir da 8ª repetição as reações foram submetidas à eletroforese capilar quinzenalmente e não semanalmente como as anteriores (Figuras 22 e 23).

A análise das repetições (Figuras 22 e 23) mostra que até a 9ª repetição, os resultados das reações mantiveram-se inalterados. Entretanto, a partir da 10ª repetição, os fragmentos correspondentes às sondas de braços longos dos cromossomos 4, 19, 20, 22 e X/Y se mostraram alterados em relação aos resultados das semanas anteriores. É oportuno salientar que os dados da repetição R5 foram perdidos quando da formatação do microcomputador acoplado ao equipamento ABI-PRISM® 310 e por isso não foram analisados, fato que não prejudicou o resultado final.

Os produtos de amplificação da técnica de MLPA levados ao aparelho ABI-PRISM® 310 para eletroforese capilar são marcados com o fluoróforo 6-FAM

(6-carboxifluoresceína; $C_{21}H_{12}O_7$), que contém em sua fórmula a fluoresceína, que é o reagente fluorescente mais comumente empregado em biomoléculas, se caracterizando tanto pelo rendimento alto, quanto pela alta solubilidade em água. Porém, como todo composto fluorescente, sua meia vida é relativamente curta, devido à fotossensibilidade. Diante disso, para manter sua utilidade por um tempo maior, devem ser armazenados sob baixas temperaturas para evitar sua degradação, e ao abrigo da luz, para que não reajam à luminosidade (143).

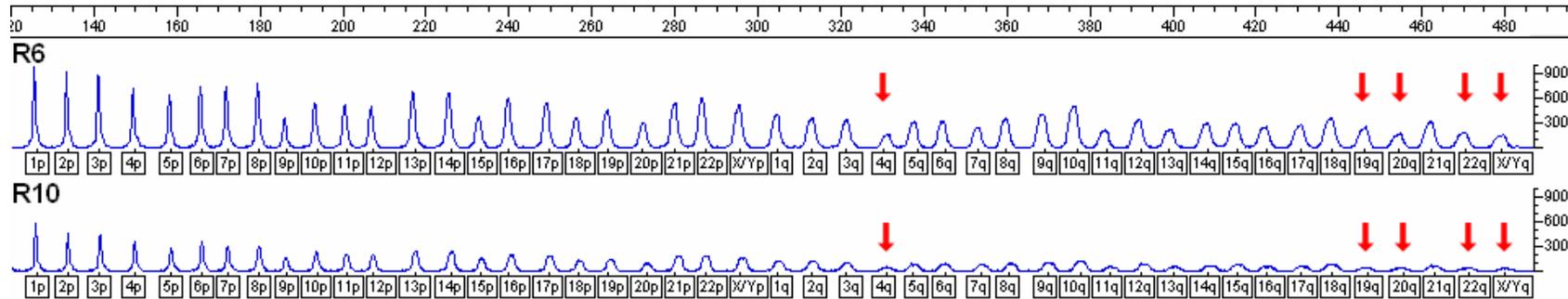


Figura 22 Gráfico de repetição de reação controle (R6 – R10), segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Applied Corporation, Estados Unidos*).

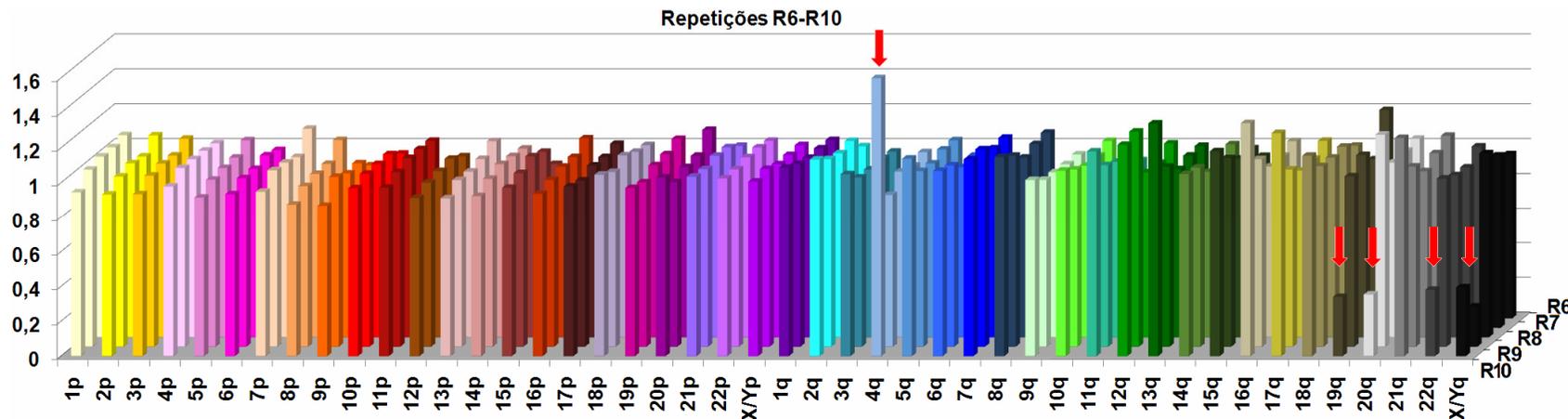


Figura 23 Gráfico de repetição de reação controle (R6 – R10), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

5.2.3. Possibilidade de diminuição do protocolo, para 1/2 ou 2/3 do recomendado pelo fabricante.

Na técnica de MLPA, o produto final por reação corresponde a um volume de 50 μ L, mas apenas aproximadamente 2% são utilizados na eletroforese capilar, levando ao descarte de grande quantidade do produto de reação.

Apesar de a técnica ter um custo por paciente relativamente pequeno quando comparada a outros métodos, torna-se interessante verificar a possibilidade de reduzir os volumes preconizados no protocolo, com o objetivo de aumentar o rendimento do *kit* e diminuir o volume descartado.

Diante disso, a estratégia adotada foi, a partir de um controle do sexo masculino sem alteração, realizar a técnica de MLPA a partir de um protocolo reduzido à metade (50%R) e também em 2/3 (75%R) do original. Em seguida, esses dados foram comparados com o resultado de uma reação realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (R).

Tendo em vista que a quantidade de reagentes utilizada na reação é proporcionalmente igual, tanto no protocolo original quanto no modificado, seria esperado observar resultados semelhantes nas três situações. Porém, comparando-se os resultados encontrados (Figuras 24 e 25) foram observadas deleções e duplicações em várias regiões subteloméricas [del(1p) e del(9p); dup(2p), dup(10q) e dup(19q), entre outras], não esperadas em controles sem alteração.

Uma justificativa plausível para tais resultados seria os volumes dos reagentes no experimento. Segundo o protocolo original são utilizados volumes pequenos de cada reagente. Quando se diminui a quantidade desses, mesmo que proporcionalmente, é possível que haja alguma dificuldade de se conduzir o experimento, como volume menor de reação, ou mesmo redução da quantidade disponível de tampões e sondas, por exemplo, ocasionando um anelamento incorreto das últimas ao DNA estudado, o que, conseqüentemente, alteraria o resultado.

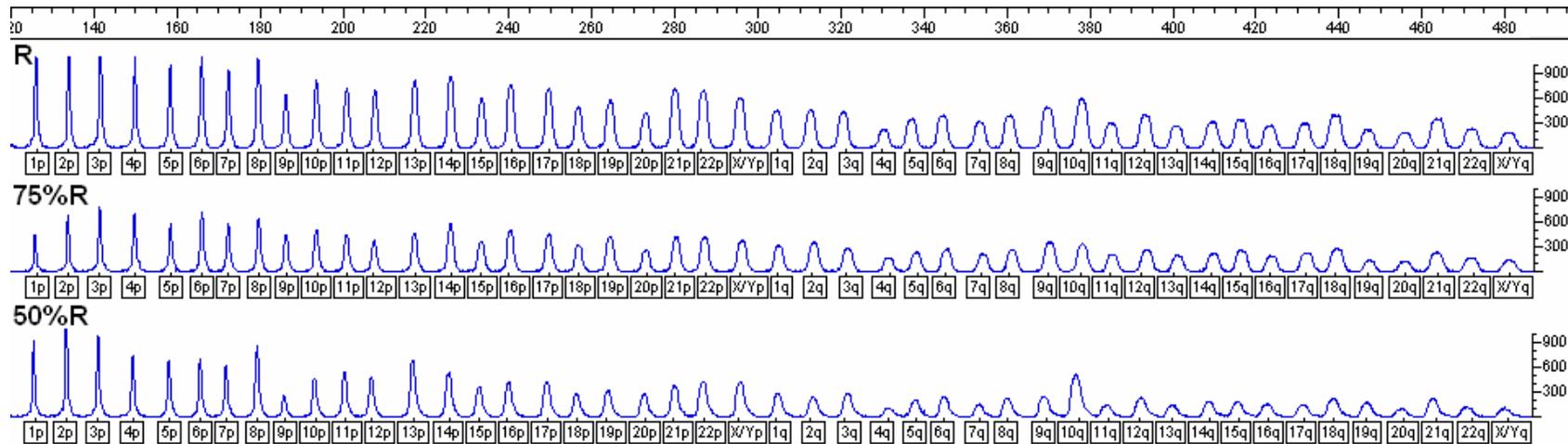


Figura 24 Gráfico de reação-contrôle com protocolo original (R), com protocolo reduzido para 75% (75%R) e com protocolo reduzido para 50% (50%R), segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

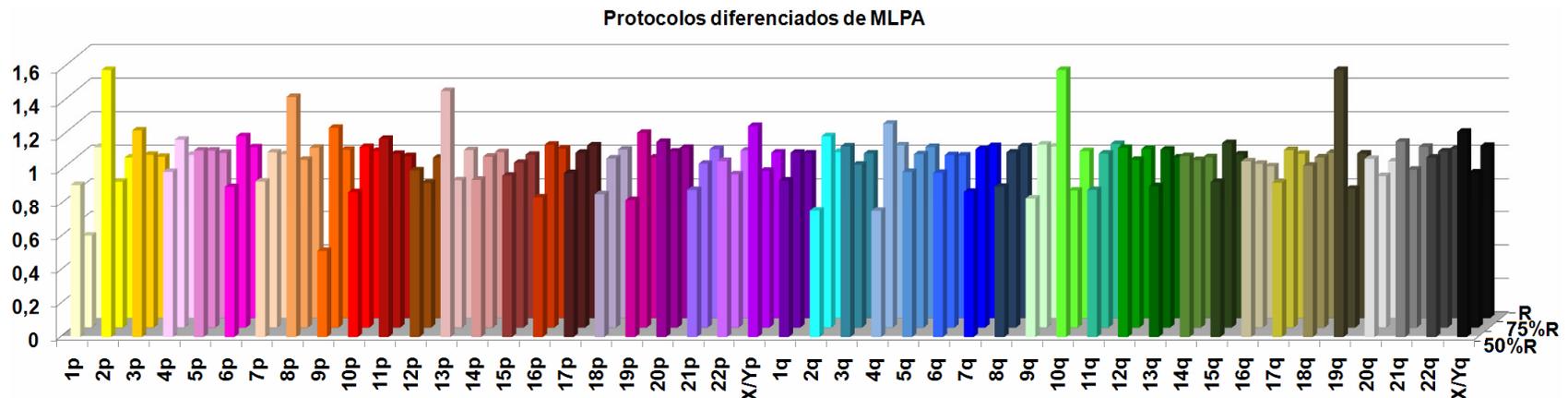


Figura 25 Gráfico de reação-contrôle com protocolo original (R), protocolo reduzido para 75% (75%R) e com protocolo reduzido para 50% (50%R), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

A ocorrência de acréscimos e decréscimos na temperatura durante a técnica de MLPA tem como consequência a evaporação da solução de reação durante o experimento, e uma quantidade maior de volume evaporado alteraria sensivelmente o resultado final. Seguindo esse raciocínio, quando se reduz os reagentes do protocolo, o volume final de reação é menor, ficando mais sujeito a alterações decorrentes de evaporação, fato que poderia justificar os resultados anômalos encontrados nos testes em que foram utilizados protocolos reduzidos. Dessa maneira, a intenção de se trabalhar com os protocolos de MLPA modificados pela metade ou 2/3 do original pode levar a resultados falsos positivos, não sendo, portanto, aconselhado.

5.2.4. Quantidade de DNA utilizado na reação

Segundo a empresa MRC-Holland, a quantidade de DNA a ser utilizada na técnica deve ser suficiente para que ocorra anelamento das sondas no material genômico e posterior união das mesmas pela enzima ligase dependente de temperatura. Assim, é recomendada a utilização de quantidade mínima de 20 ng de DNA. Porém, com quantidade estimada entre 50 - 500 ng de DNA é possível a obtenção de resultados mais confiáveis, já que isso permite que todas as sondas anelem-se ao DNA, sem competição entre as mesmas (143).

Assim, com o objetivo de determinar qual seria a quantidade de DNA satisfatória para realização dos testes de MLPA, foram realizados experimentos a partir de um controle 46,XY normal, com quantidades diferentes de DNA em um mesmo ensaio (50 ng, 150 ng e 500 ng). Os resultados obtidos foram comparados e plotados em gráfico (Figuras 26 e 27). Inesperadamente, foram observadas variações nas intensidades das amplificações referentes a 1p, 9p e 4q, fato que deve ser devido a possíveis alterações subteloméricas ou polimorfismos na região de anelamento das respectivas sondas. Considerando-se que essas sondas se anelam a regiões com alta incidência de polimorfismos, as mesmas foram substituídas por outras sondas, na atualização do *kit* em questão.

Como discutido anteriormente, no *kit* de MLPA, além dos fragmentos controle de desnaturação de DNA (DD), existem os fragmentos controle específicos para a quantidade de DNA (DQ) (Tabelas III, IV, VII, págs. 57, 58 e 66). O objetivo da inclusão desses últimos é sinalizar que a quantidade de DNA utilizada na amostra é menor do que os 20 ng necessários para a obtenção de resultados confiáveis. É importante destacar que a amplificação dos produtos dos fragmentos DQ é visível somente quando a quantidade de DNA está abaixo da necessária para que ocorra a ligação com as sondas do *kit*. Por outro lado, quando a quantidade de DNA utilizada ultrapassa 100 ng, a amplificação dos quatro fragmentos controle DQ é quase imperceptível (143).

Assim, nos testes realizados com quantidades diferentes de DNA, os fragmentos DQ não foram observados, concluindo, que a quantidade de amostra utilizada no experimento foi satisfatória. Porém, deve-se ressaltar que a presença de alterações no ensaio pode ser justificada pelas quantidades diferentes de DNA utilizado nas reações, o que levaria a uma normalização incorreta dos dados e, portanto, a resultados errôneos. Dessa forma, recomenda-se que, para todo *kit* seja feito um primeiro ensaio com quantidades diferentes de DNA, a fim de se estimar a faixa de concentração em que sejam visualizadas as amplificações mais satisfatórias e em seguida, a utilização de quantidades similares no mesmo ensaio, para que a normalização e a análise posterior sejam corretas.

Quanto à concentração ideal para o experimento com o *kit* P036D, observou-se que quantidades de DNA estimadas entre 150 ng e 250 ng geram resultados mais confiáveis e precisos, sendo, portanto, as que foram utilizadas nos experimentos neste trabalho (dados mostrados no item “Validação da técnica utilizando controles negativos e com alteração”, pág.77). Quanto às concentrações tais como 50 ng (A) e 500 ng (B), nota-se que a quantidade reduzida de DNA pode contribuir para um resultado falso positivo, uma vez que há a possibilidade de não anelamento de algumas sondas, resultando em um viés de normalização e análise. O mesmo pode ocorrer com quantidade superiores devido às concentrações elevadas de contaminantes, como sal e resíduos de extração.

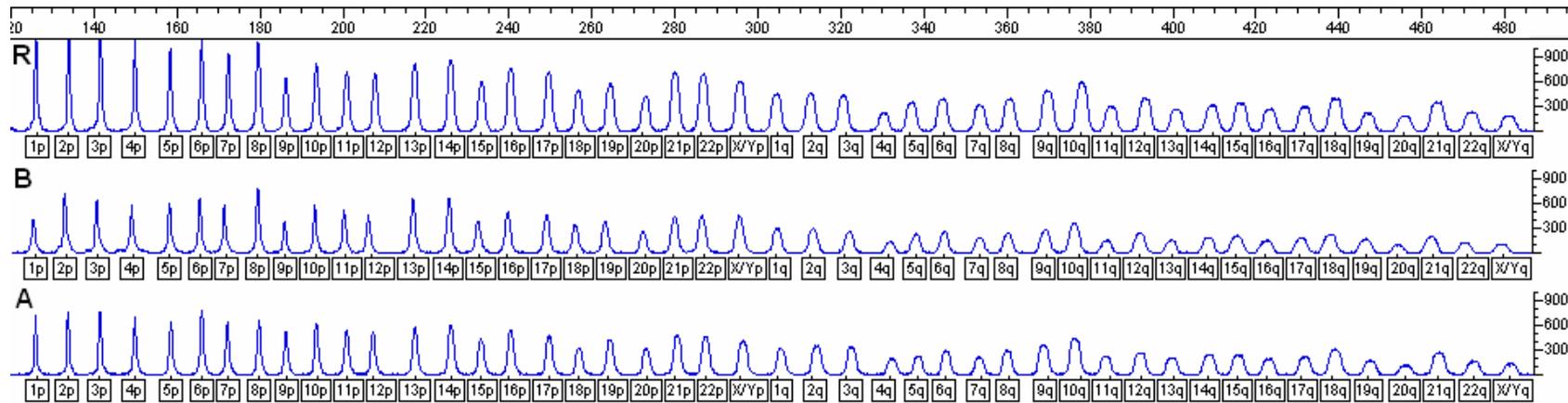


Figura 26 Gráfico de reação-contrôle com 150 ng de DNA (R), com 500 ng de DNA (B) e com 50 ng de DNA (A), segundo o programa Genotyper® (Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos).

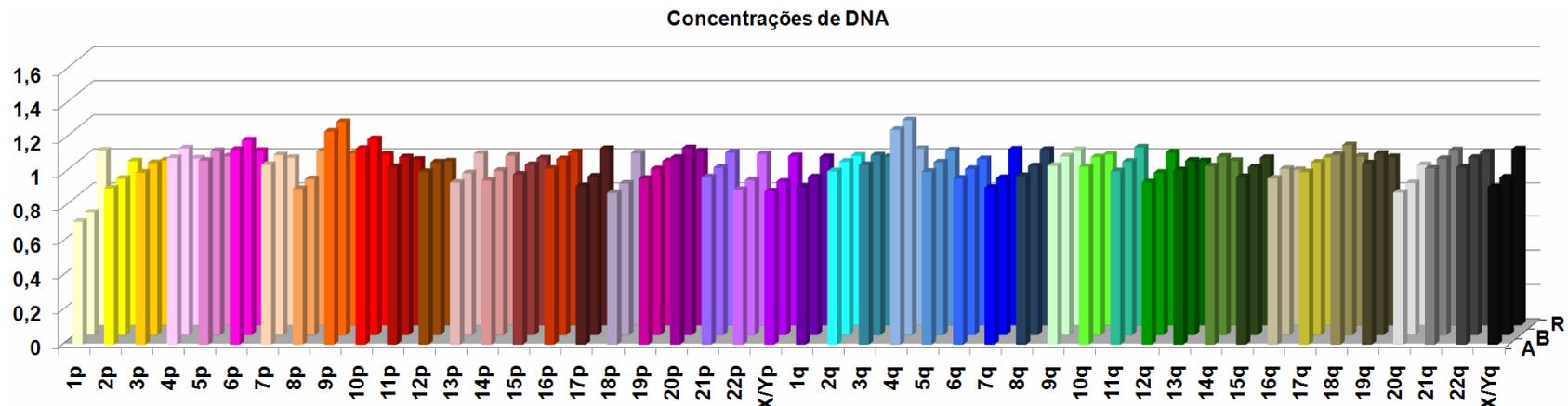


Figura 27 Gráfico de reação-contrôle com 150 ng de DNA (R), com 500 ng de DNA (B) e com 50 ng de DNA (A), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

Conclui-se, portanto, que para a padronização correta dos *kits* de MLPA é necessária a realização de testes com concentrações diferentes de DNA (incluindo a concentração de 150 ng) para que se obtenha resultados satisfatórios e confiáveis.

5.2.5. Plataforma de análise

Após a separação e a visualização dos produtos de amplificação por eletroforese capilar, a análise da reação de MLPA pode ser realizada pela visualização dos produtos de amplificação ou pela normalização dos dados de altura ou área dos picos (143).

A análise por visualização dos produtos de amplificação se baseia na comparação isolada de cada pico da reação-controle normal com a reação do indivíduo estudado, por exemplo, a comparação entre as alturas dos fragmentos 1p da reação-controle e da reação-teste. Dessa forma, a observação de um decréscimo relativo na altura do pico (entre 35 – 55%) mostra uma deleção da sequência estudada. Já uma duplicação é resultado de um acréscimo na altura do pico, entre 30 – 55% (143).

Apesar de ser mais rápida e não requerer normalização prévia dos dados, essa forma de análise é muito subjetiva e sujeita a erros.

Um segundo tipo de análise dos dados obtidos pela técnica de MLPA refere-se à normalização dos parâmetros de altura ou área dos produtos de amplificação. Para tanto, são necessários programas específicos de genotipagem, que forneçam os dados de altura e área dos fragmentos, como os já mencionados GeneScan® e Genotyper®. Uma vez identificados, esses dados podem ser normalizados pelos programas Coffalyser MLPA – *data analysis software*® ou planilhas específicas para kit comercializado (143).

O programa Coffalyser MLPA – *data analysis software*® se baseia em plataforma Excel e pode ser utilizado com a versão 2003+ ou superior *Microsoft Office version 2003+*. É recomendado pelo fabricante dos *kits* e está disponível para *download* gratuitamente no sítio web da empresa, além de ser

constantemente atualizado (143). Todos os passos para a normalização dos dados estão incluídos, além de correções para efeitos característicos da maioria das misturas de sondas, que correspondem ao decréscimo na altura/área do pico dependente da sonda.

Com essa forma de análise, pode-se ter acesso direto a informações sobre a se a quantidade de DNA utilizada na reação foi satisfatória ou não, se a desnaturação da amostra foi efetiva ou não, se houve ligação entre os fragmentos que compõem cada sonda e até mesmo com relação à procedência da amostra estudada (sexo feminino ou masculino) (143).

Entretanto, há a desvantagem de esse tipo de programa exigir um tempo maior para a análise, por se tratar de um processo laborioso, com muitos passos a serem percorridos até a conclusão, entre os quais importação dos dados das reações; inclusão e retirada de amostra de referência; filtro dos dados inseridos e normalização dos valores encontrados.

Diante dessa situação, diversos grupos que utilizam os *kits* de MLPA em suas pesquisas, acabaram por desenvolver planilhas de análise simplificadas e específicas para cada *kit*. Entre tais grupos encontra-se o *National Genetics Reference Laboratory Manchester* (NGRL), que desenvolveu a planilha de análise dos dados P036C Telomere Adaptive QC, entre outras, e que foi utilizada neste estudo (170).

Esse tipo de planilha também é baseado na plataforma Excel e pode ser utilizado com a versão 2003+ ou superior *Microsoft Office version 2003+*. Também é recomendada pelo fabricante, como alternativa à análise realizada pelo programa Coffalyser® e também está disponível gratuitamente para *download* no sítio web da empresa (143), além do sítio web do grupo que a produziu (170). De maneira análoga, todos os passos para a normalização dos dados estão incluídos.

A escolha dessa planilha específica como forma de análise neste estudo levou em conta as vantagens desse tipo de análise em relação ao programa Coffalyser®.

A planilha desenvolvida pelo grupo de Manchester é baseada na plataforma Excel® e inclui quatro páginas. A primeira se destina à inclusão dos

dados de área ou altura dos fragmentos; a segunda para visualização dos resultados, ficando a terceira e a quarta para os cálculos de normalização (170).

A primeira página, por sua vez, é formada por três blocos grandes, com o primeiro destinado à inclusão dos dados de cinco controles sem alteração (subdividido em cinco células menores), os quais são utilizados na normalização dos dados e na comparação com os dados das reações-teste. Já o segundo bloco, cuja utilização na análise é facultativa, se destina à inclusão dos dados de um controle alterado, enquanto no terceiro bloco podem ser inseridos dados de até 10 reações-teste (portanto, subdividido em 10 células menores). Dessa forma, em uma mesma planilha, é possível analisar até 10 reações ao mesmo tempo (170).

Uma vez inseridos dados de altura ou área relativos à amplificação dos fragmentos, basta acessar a outra página da qual a planilha é composta que o resultado final da normalização estará disponível (170).

À semelhança do proposto pelo programa Coffalyser®, os intervalos de normalidade, deleção e duplicação admitidos na planilha formulada pelo grupo Manchester são semelhantes: normalidade (valores entre 0,8 – 1,2); deleção (0,35 – 0,7) e duplicação (1,30 – 1,65). Porém, podem ser feitos ajustes nesses intervalos, de acordo com o *kit* utilizado.

Como parte da análise deste projeto, observou-se que o programa Coffalyser® apesar de fornecer dados como quantidade de DNA (se satisfatória ou não), presença ou ausência dos fragmentos DD e DQ, esses não incluídos na planilha produzida pelo grupo Manchester, é pouco didático e implica em um dispêndio maior de tempo por parte do analisador. Tais aspectos, associados ao fato de que o objetivo do método é a agilidade e facilidade na obtenção dos dados, favorecem o segundo programa como alternativa à utilização do programa Coffalyser®.

5.2.6. Elaboração de um protocolo detalhado, com todos os passos da técnica, já ajustada à infra-estrutura da instituição.

Com a análise e discussão da técnica de MLPA foi elaborado um protocolo de acompanhamento do método (ANEXO 4), a fim de otimizar a realização do experimento, com segurança e confiabilidade.

A partir dos resultados obtidos com a padronização da técnica de MLPA, e com a demonstração de que a mesma reúne condições de ser aplicada adequadamente, foi realizado um estudo envolvendo indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática, atendidos do Serviço de Genética Clínica, FCM-Unicamp.

5.3. Estudo envolvendo pacientes com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática atendidos no Departamento de Genética Médica FCM-UNICAMP.

Neste estudo, foram incluídos 62 indivíduos (17 do sexo feminino e 45 do sexo masculino, com idades variando entre 8 meses e 44 anos, na data da realização dos testes (ANEXO 2), selecionados entre indivíduos em acompanhamento no Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica FCM-Unicamp para investigação diagnóstica de DM, já submetidos a exame de cariótipo e, quando pertinente, pesquisa da mutação do X-frágil, não possuindo quadro clínico sugestivo de algum diagnóstico específico, avaliados conforme os critérios proposto por De Vries *et al.* (168) (pontuação - ANEXO 2) e estudados a partir do *kit* SALSA MLPA P036, conforme descrição apresentada anteriormente.

Entre esses, 60 não apresentaram alteração subtelomérica (Figuras 28 e 29).

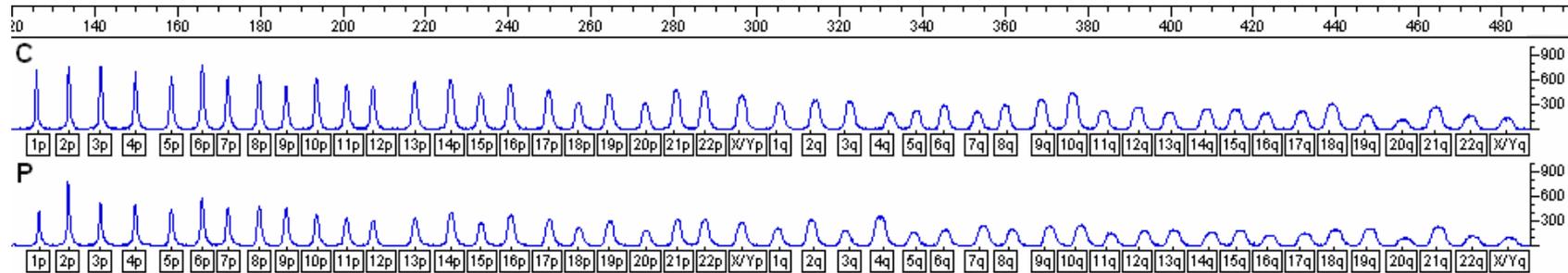


Figura 28 Gráfico de reação para os indivíduos sem alteração (P) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o *kit* SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

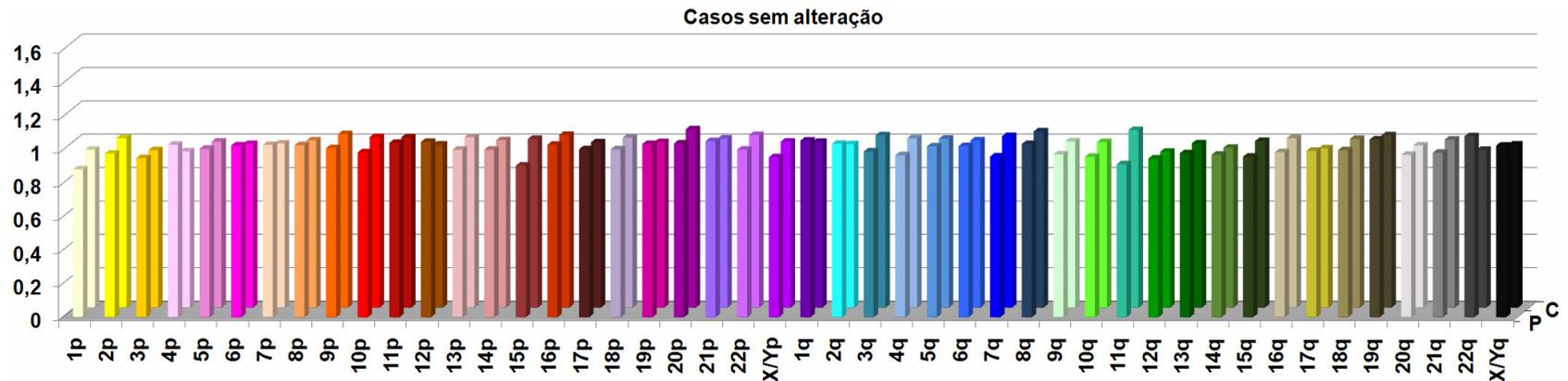


Figura 29 Gráfico do resultado de MLPA para os indivíduos sem alteração (P) em comparação ao controle normal (C) para o *kit* SALSA MLPA P036, segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

5.3.1. Casos com resultados indicativos (ou sugestivos) de rearranjo subtelomérico.

Inicialmente, dos 62 pacientes investigados pela técnica de MLPA, utilizando o *kit* SALSA MLPA P036, foram encontradas alterações em seis indivíduos (9,76%). Dentre essas, quatro (6,5%) caracterizadas como del(12p), não foram confirmadas pelo *kit* SALSA MLPA P070, sendo identificadas como polimorfismos, pela técnica de sequenciamento automático. As duas restantes (3,2%) foram observadas pelo *kit* de confirmação, sendo, portanto, consideradas como associadas ao fenótipo anômalo dos respectivos pacientes. Em um deles, foi detectada uma deleção 1p36 e em outro foi constatado rearranjo indicativo de deleção 5p e duplicação 9p, sendo o quadro clínico sugestivo da síndrome do *cri-du-chat*.

Esses resultados não diferem dos observados em estudos anteriores, pois entre vários que demonstraram a aplicabilidade do método de MLPA na investigação de atraso do desenvolvimento ou DM, a frequência de alterações subteloméricas foi estimada entre 3,9% e 27,5%, dependendo dos critérios utilizados para o estudo e do tamanho da amostra (65,71,86,10,90,11,92,95,97,98,99,102).

A descrição de cada uma dessas alterações e suas respectivas confirmações é apresentada a seguir.

5.3.1.1. Alteração del(12p)

Em quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61) [ANEXO 2] foi identificada uma deleção da região subtelomérica do braço curto do cromossomo 12 [del(12p)].

Segundo o fabricante, no *kit* SALSA MLPA P036 (Tabela III, pág. 57) a sonda subtelomérica referente à porção 12p foi desenhada para o gene *SLC6A12*, pertencente à família 6 dos carreadores de soluto (transportador neurotransmissor betaina/GABA), localizado em 12p13 [OMIM 603080 (179)]. Já para o

kit de confirmação SALSA MLPA P070 (Tabela VII, pág. 66), o gene escolhido foi o *JARID1A*, associado à regulação de proliferação celular, localizado em 12p11 [OMIM 180202 (179)] próximo ao gene *SLC6A12* (Figura 30) (143).

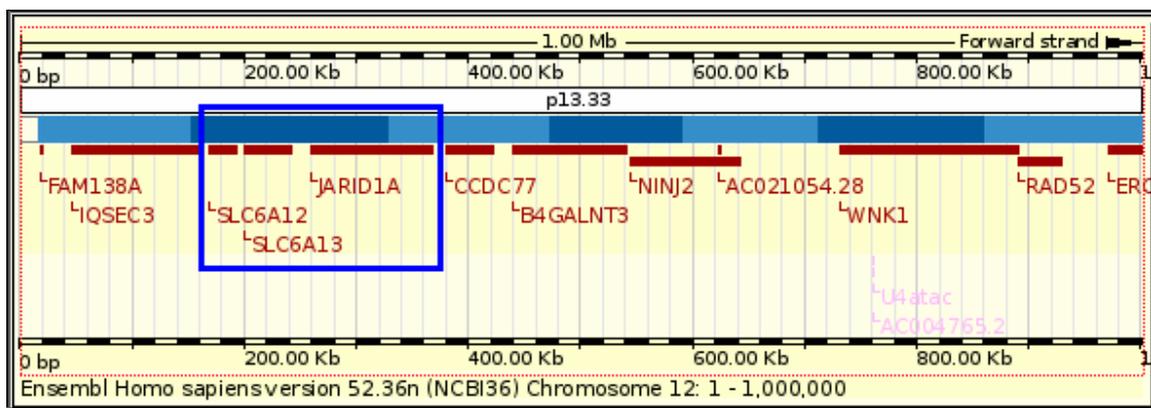


Figura 30 Localização dos genes *SLC6A12* e *JARID1A* (cromossomo 12p), cujas sequências foram utilizadas para a confecção das sondas 12p presentes nos kits SALSA MLPA P036 e P070, respectivamente (180).

Depois de observada a suposta alteração em 12p nesses quatro indivíduos (Figuras 31 e 32), foi feito novo ensaio de MLPA com o kit SALSA MLPA P070 para confirmação dos resultados (Figuras 33 e 34) e em todos os quatro indivíduos houve amplificação da região 12p, contrariando o resultado encontrado pelo kit SALSA MLPA P036.

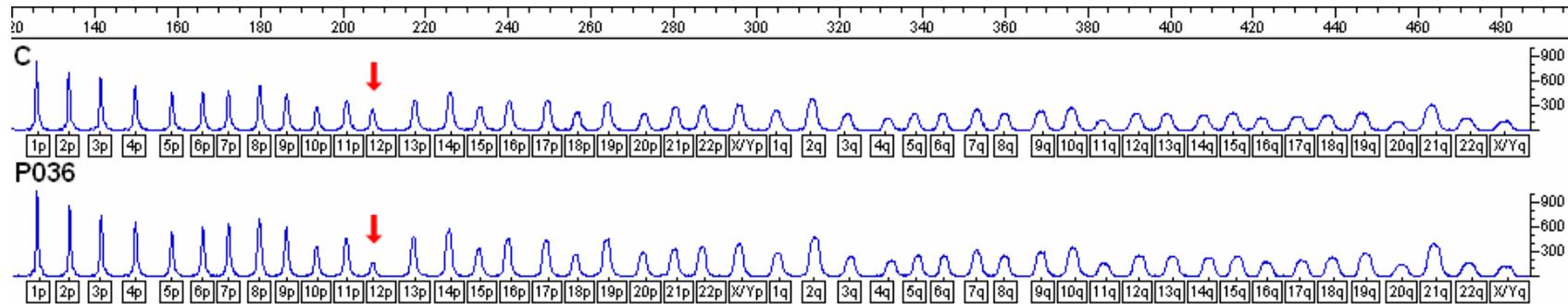


Figura 31 Gráfico de reação para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o *kit* SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Aplaera Corporation, Estados Unidos*).

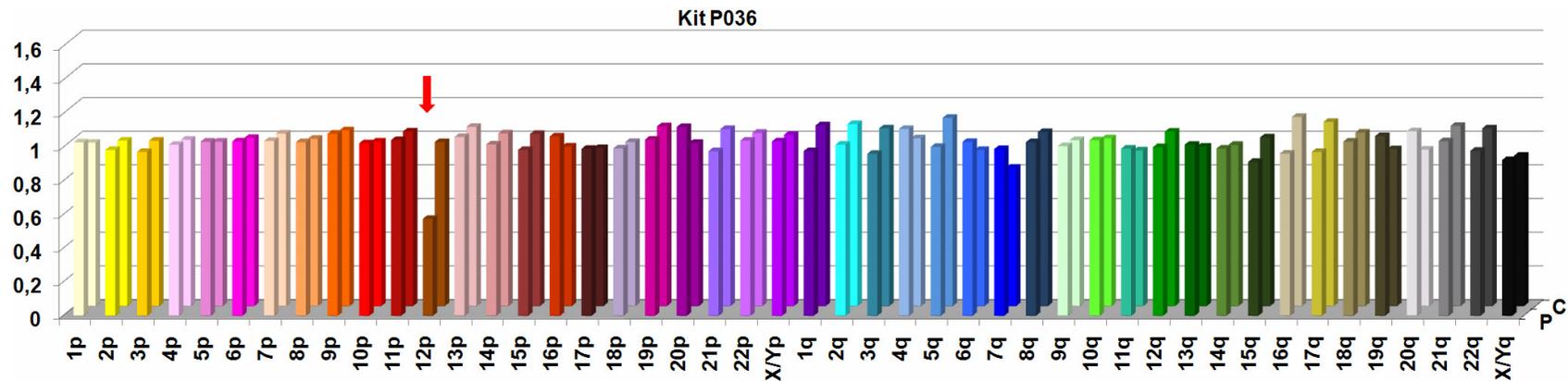


Figura 32 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P036 para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61), em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.

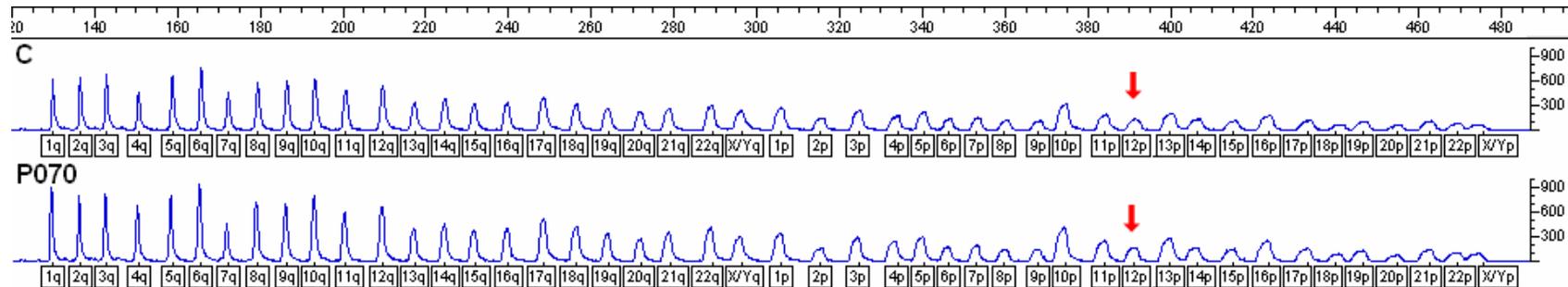


Figura 33 Gráfico de reação para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61) em comparação a reação controle sem alteração (C) para o *kit* SALSA MLPA P070, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Applied Biosystems Corporation, Estados Unidos*).

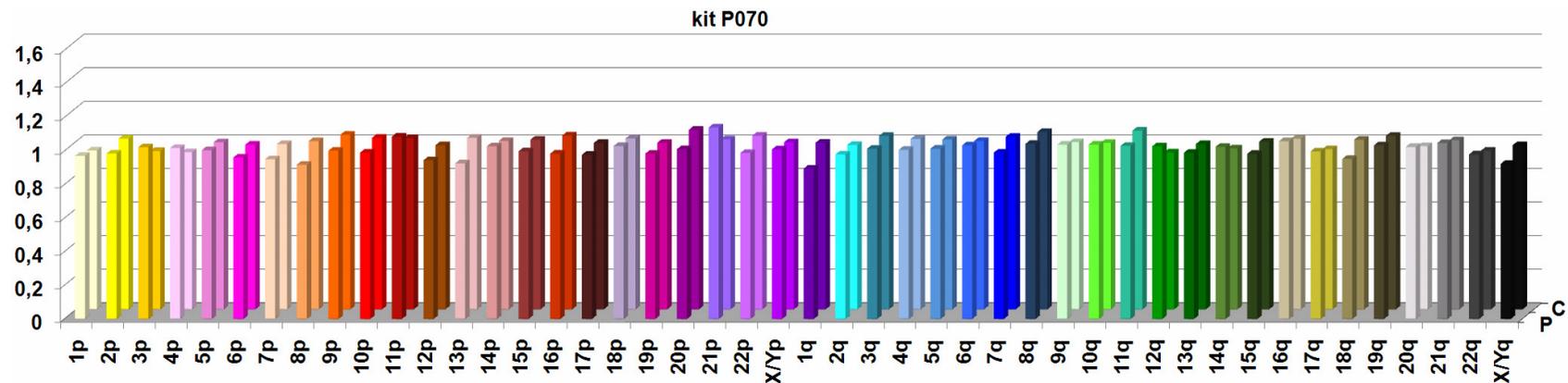


Figura 34 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P070 para os quatro indivíduos (P53, P56, P59 e P61), em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.

Nessa situação, conforme o fabricante (143), há necessidade de confirmação do dado por outro método, como FISH ou sequenciamento. Sendo assim, foi realizado o sequenciamento do gene *SLC6A12*, mais precisamente da região complementar à sonda contida no *kit* SALSA MLPA P036.

Para o sequenciamento, foi realizada a amplificação do fragmento de interesse em cada paciente por PCR, como mostrado na Figura 35. Em seguida, foi feita a reação de sequenciamento, cuja leitura no sequenciador ABI-PRISM® 3700 *DNA Analyser* (*Applied Biosystems - Applied Biosystems Corporation*, Estados Unidos) detectou a mesma alteração nucleotídica, dentro da região de ligação da sonda, em todos os quatro indivíduos (Figura 36). Para identificar o tipo de alteração observada foi pesquisado nos bancos de dados, como por exemplo, o Entrez SNP do NCBI (181).

A troca A>G encontrada na região corresponde a um polimorfismo de base única (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) denominado rs60220187, descrito na base de dados *Entrez SNP* do NCBI, que compreende a região 3'UTR (região não traduzida) do exon 18 do gene *SLC6A12*. Segundo a mesma base de dados, não há associação entre esse polimorfismo e qualquer manifestação clínica.

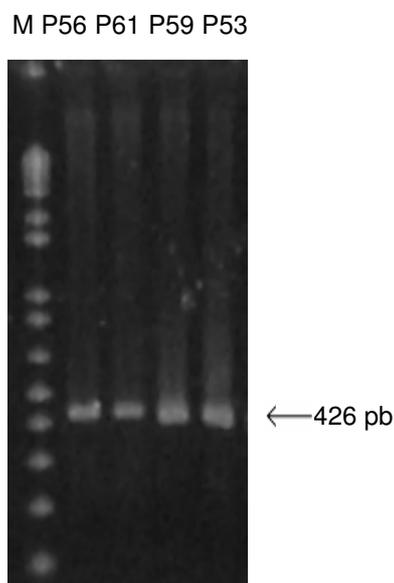


Figura 35 Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do fragmento *SLC6A12* nos indivíduos P56, P61, P59 e P53. M: marcador de peso molecular 1 Kb.

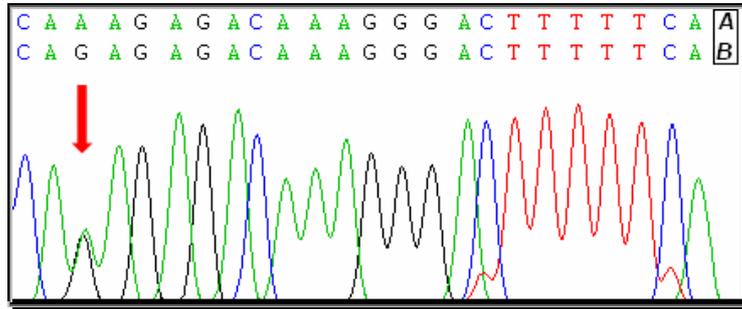


Figura 36 Sequenciamento do fragmento complementar à sonda 12p (*kit* SALSA MLPA P036) correspondente a uma porção da sequência do exon 18 do gene *SLC6A12*. Em **A** a sequência normal, sem alteração. Em **B** a sequência encontrada nos quatro indivíduos, cujo resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P036 mostrara deleção. No detalhe, a troca nucleotídica A>G, observada nesses indivíduos (SNP rs 60220187) (180).

Sob esse aspecto, é importante ressaltar que as sondas de MLPA são sensíveis a pequenas alterações na sequência de anelamento ao DNA genômico (143). Assim, mudanças nucleotídicas muito próximas (a uma distância de 10 pares de base) ao sítio de anelamento ou dentro do mesmo, inibem ou desestabilizam a ligação dos oligonucleotídeos na região em questão, os quais posteriormente seriam unidos pela enzima ligase dependente de temperatura e então amplificados por PCR. Assim, nesses casos, o resultado do teste seria uma deleção da região estudada, porém, na realidade, tratar-se-ia de um resultado falso-positivo (71,90,95). Emparelhamentos errôneos de sonda também podem, teoricamente, resultar em falsos positivos. O quanto esses *mismatches* desestabilizam a ligação das sondas depende da localização desses emparelhamentos, do seu tipo e também da temperatura de anelamento à sequência, entre outros fatores. Assim, a deleção detectada por MLPA seria consequente a um artefato de técnica (143).

A região 12p, embora rica em genes cuja correlação com DM já foi descrita (182,52,65) também é associada a polimorfismos, quando um segmento duplicado em 12p13.33 foi observado tanto em um paciente com sinais clínicos leves, quanto em um de seus genitores não afetados (65). No presente estudo, quanto à correlação genótipo-fenótipo observou-se que, à exceção da DM, os quatro pacientes, sendo dois deles irmãos (P56 e P61), não apresentavam as características fenotípicas (ANEXO 3) descritas em indivíduos com essa deleção, como anomalias dentárias, auriculares e

digitais (52). Diante disso, a alteração nucleotídica na sequência de hibridização da sonda 12p observada nesses quatro casos foi interpretada como um polimorfismo, não havendo registro de associação do mesmo às alterações fenotípicas na literatura, embora estudos mais extensos sejam necessários para estimar sua frequência na nossa população. Outrossim, devido ao fato de os *kits* de MLPA estarem em constante atualização, principalmente no que se refere à substituição de sondas para região não relacionadas a polimorfismos, prevenindo dessa forma a obtenção de resultados de falsos positivos, será encaminhado um aviso ao fabricante, quanto à associação dessa região a SNPs, o que possivelmente determinará a substituição dessa sonda por outra.

5.3.1.2. Alteração del(1p36)

Em um paciente (P57) foi encontrada deleção 1p36 e a análise do fenótipo clínico realmente é compatível com essa condição.

A síndrome 1p36 [MIM 607872 – (179)], determinada por deleção terminal do braço curto do cromossomo 1, cuja frequência é estimada em 1:5000 nascimentos, incide em ambos os sexos e em todas as etnias, sendo considerada a deleção terminal mais comum em humanos (183,184,185,186).

Com relação à origem, a monossomia 1p36 pode resultar de deleção terminal ou intersticial variando quanto a tamanho e pontos de quebra (187), envolvendo apenas o cromossomo 1 ou ainda outros cromossomos em rearranjos complexos (184,188). 95% das deleções são consideradas *de novo* (189) e os 5% restantes resultam de alterações de segregação a partir de translocação balanceada em um dos genitores. Quanto à origem parental, apesar de alguns resultados discordantes, a maioria dos estudos demonstra predominância da origem materna (186). Segundo a descrição de Shapira *et al.* (189), com base em 13 indivíduos com diagnóstico de deleção 1p36, entre as características faciais observadas estão ponte nasal baixa, orelhas assimétricas e queixo proeminente. Outros sinais relatados são fontanela bregmática ampla, fronte proeminente, assimetria facial, filtro longo, boca pequena, comissuras bucais desviadas para baixo, palato alto e arqueado, fenda

palatina, orelhas pequenas e(ou) dismórficas, mãos e pés pequenos, anomalias digitais (clinodactilia e camptodactilia), assim como baixa estatura, hipotonia, microcefalia, braquicefalia, cardiopatia, hipertireoidismo, hipermetropia, surdez neurosensorial, atraso do desenvolvimento e DM (191,39,186,184,188,192). Sua expressividade é variável, sendo que em alguns indivíduos o fenótipo é bem evidente, facilitando o reconhecimento clínico, mas em outros o quadro pode ser bem mais leve. A deleção também pode variar quanto ao tamanho e, frequentemente, não é detectada por exame de cariótipo convencional, sendo necessária a aplicação de técnicas mais refinadas, incluindo a de MLPA (192,188,193).

Para pesquisar alterações em 1p, a região escolhida no *kit* SALSA MLPA P036 (Tabela III, pág. 57) para o desenho da sonda está em 1p36 (gene *TNFRSF4*), enquanto no *kit* de confirmação SALSA MLPA P070 (Tabela VII, pág. 58), o gene escolhido é o *TNFRSF18*, também situado em 1p36 (Figura 37).

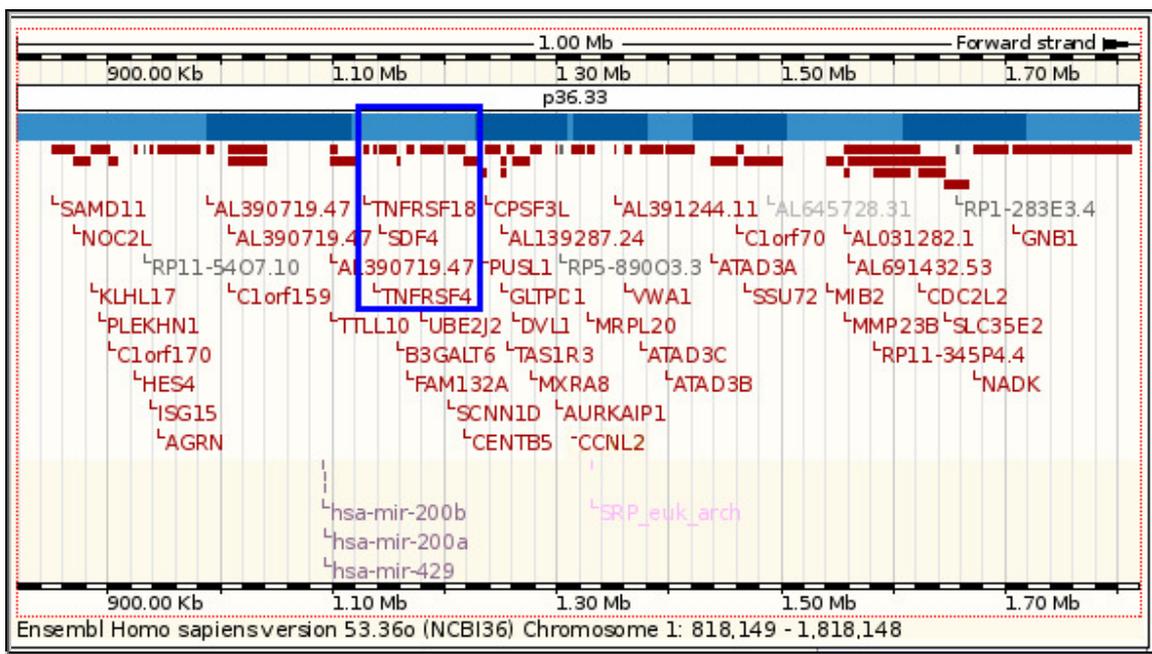


Figura 37 Localização dos genes *TNFRSF4* e *TNFRSF18* (cromossomo 1p), cujas seqüências foram utilizadas para a confecção das sondas 1p presentes nos *kits* SALSA MLPA P036 e P070, respectivamente (180).

Neste estudo, o indivíduo (P57) apresentou deleção 1p pelo *kit* SALSA MLPA P036, que foi confirmada pelo *kit* SALSA MLPA P070 (Figuras 38 a 41).

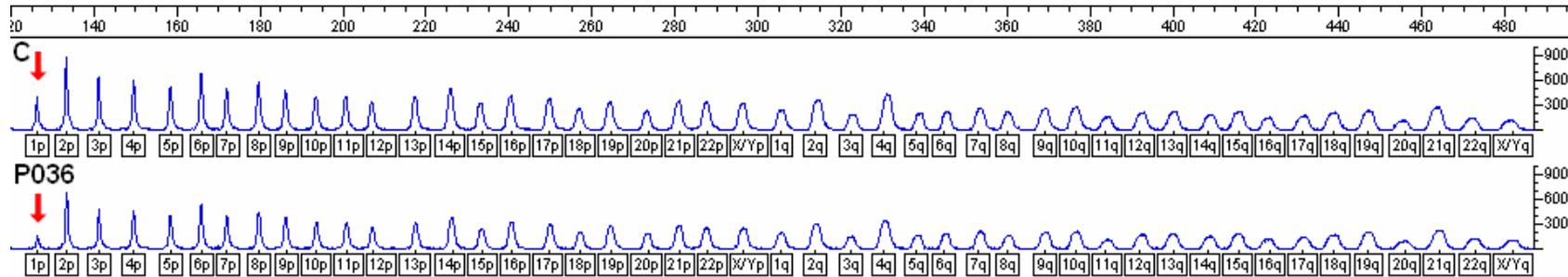


Figura 38 Gráfico de reação para o caso P57, em comparação a reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

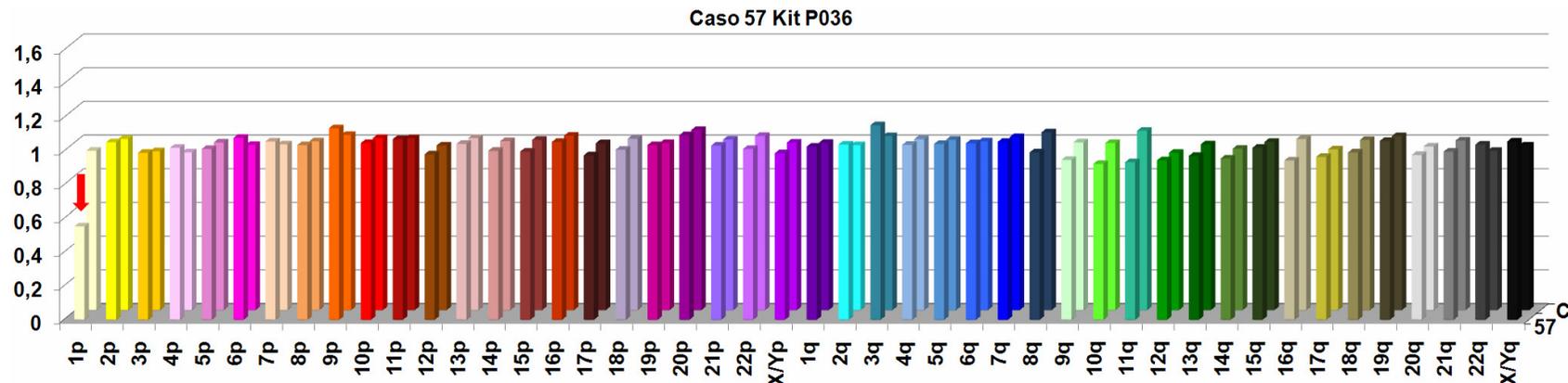


Figura 39 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P036 para o caso P57, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

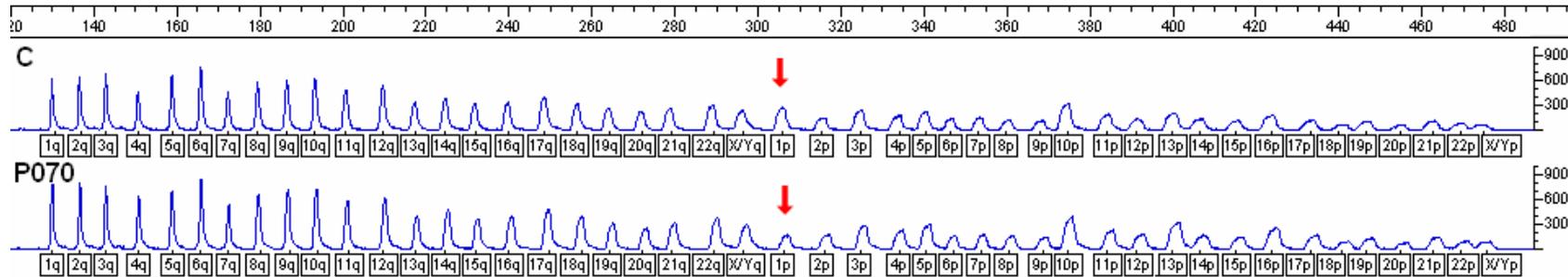


Figura 40 Gráfico de reação para o caso P57, em comparação a reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P070, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

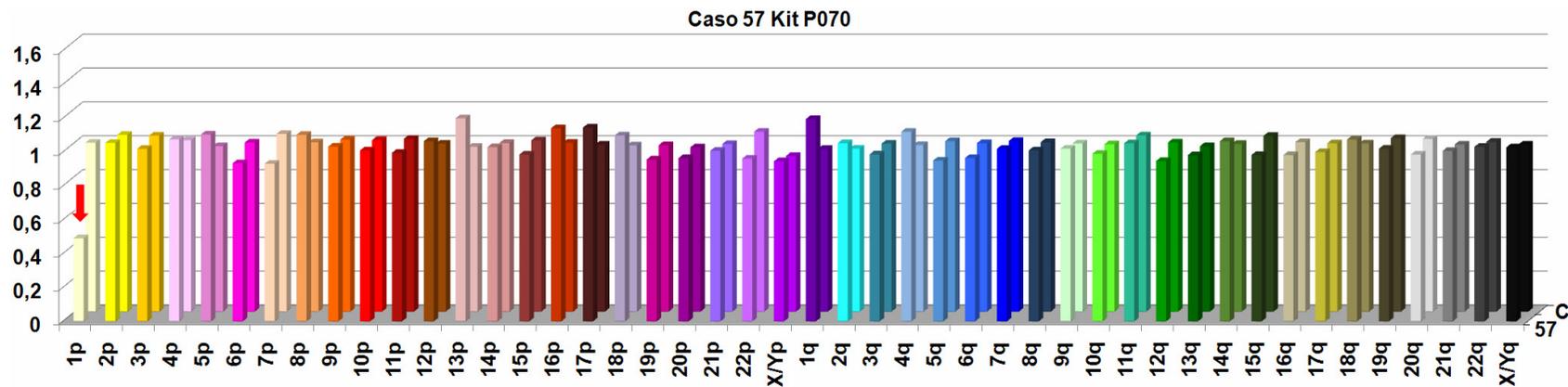


Figura 41 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P070 para o caso P57, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P070C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

Comparando-se as características do paciente analisado (P57) com outras descrições, foi observada similaridade de sinais clínicos, conforme pode ser observado na Tabela IX.

Tabela IX Características clínicas encontradas em pacientes com deleção terminal 1p36 (adaptado de 190,184,192,185,194,195).

Características	Outros estudos	Nesse estudo
Fontanela bregmática ampla	+	+
Microcefalia	+	-
Braquicefalia	+	+
Occipital plano	-	+
Fronte proeminente	+	+
Hipertelorismo	+	-
Enoftalmia	+	+
Epicanto	+	+
Estrabismo	+	+
Ponte nasal baixa	+	+
Hipoplasia malar	+	+
Bochechas proeminentes	+	+
Filtro longo	+	-
Filtro curto	-	+
Boca pequena	+	+
Comissuras bucais desviadas para baixo	+	+
Palato alto e arqueado	+	+
Fenda palatina	+	-
Queixo proeminente	+	-
Orelhas dismórficas	+	+
Mãos pequenas	+	ND
Clinodactilia	+	-
Pés planos	-	+
Cardiopatia	+	-
Dificuldade de alimentação	+	-
Hipotonia	+	-
RDNPM	+	+
Surdez neurosensorial	+	-
Distúrbio na fala	+	+
Convulsões	+	+

ND: não determinado

Desde os primeiros relatos, há interesse na correlação genótipo-fenótipo da deleção 1p36 e vários genes vêm sendo considerados como candidatos potenciais para algumas características mais frequentes. Segundo revisão realizada por Gajecka *et al.* (185), o gene *KCNAB2* (*Potassium Channel, Voltage-gated, Shaker-Related Subfamily Beta Member 2*) possivelmente atuaria como modificador de outros genes relacionados à ocorrência de epilepsia nesses indivíduos, enquanto o gene *GABRD* (*Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Delta*) estaria relacionado a anomalias neuropsiquiátricas e *MMP23* (*Matrix Metalloproteinase 23*), regulação do fechamento da fontanela, entre outros (185).

Segundo dados recentes, as deleções terminais em 1p36 ocorrem em 0,5-0,7% dos indivíduos com DM idiopática (196), sendo descritos até o momento mais de 200 casos, a maioria detectada por triagem para deleções terminais em pacientes com malformações e(ou) DM idiopática (10,77,167,192,188, entre outros).

Nos programas de triagem de rearranjos subteloméricos por meio da técnica de MLPA, a deleção 1p36 é comumente observada, sendo destacada não apenas sua importância como causa de DM inicialmente tida como idiopática, mas também a eficácia do método na identificação dessa alteração (65,71,10,95).

Nesses estudos, recomenda-se a técnica de FISH para validação das alterações detectadas por MLPA. Outra indicação para aplicação do FISH se relaciona à possibilidade de distinguir cromossomos derivados, eventualmente herdados de um genitor com rearranjo balanceado, de deleções terminais puras, achado que modificaria de maneira substancial o processo de aconselhamento genético para os envolvidos (184).

Diante disso, o método de FISH foi aplicado nesse caso e o resultado, apresentado na Figura 42, corrobora o observado por MLPA, demonstrando a eficácia dessa técnica de MLPA nessa situação.

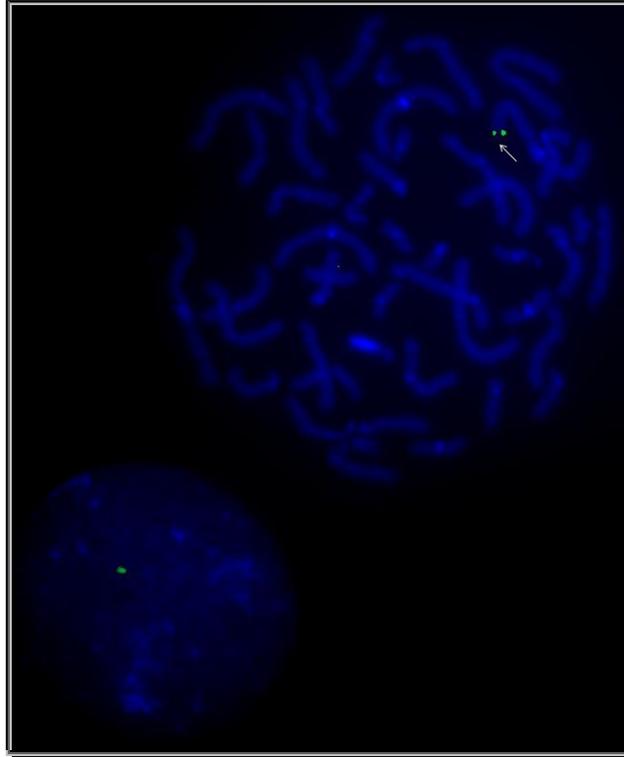


Figura 42 Resultado de FISH com sonda subteloamérica para a região 1p mostrando apenas um sinal no cromossomo 1 normal (seta). A ausência do outro sinal indica a deleção da região em 1p36, corroborando com o resultado anômalo encontrado pela técnica de MLPA.

5.3.1.3. Alteração *del(5p)*, *dup(9p)* associada a síndrome do *cri-du-chat*

Em um paciente (P64) foi encontrado rearranjo indicativo de deleção 5p e duplicação 9p e análise do fenótipo clínico, sugestivo da síndrome do *cri-du-chat*.

A síndrome do *cri-du-chat* (SCDC) [MIM 123450 (179)] resulta de deleção terminal ou intersticial do braço curto do cromossomo 5, que pode envolver desde uma única banda em 5p15.2 até a totalidade do braço curto do cromossomo 5. Descrita pela primeira vez por Lejeune e colaboradores, em 1963, também é conhecida como síndrome 5p- ou monossomia 5p e sua incidência é estimada entre 1:15000 a 1:50000 nascimentos, com prevalência de 1:350 na população com retardo mental (197,198,199). Aproximadamente 80% dos casos resultam de deleção terminal 5p *de novo*, com 10% relacionados a translocação equilibrada parental e os 10% restantes, a

alterações citogenéticas raras, como cromossomo em anel e mosaicismo (200,201,202,25,203,204,205).

Entre as características principais da deleção 5p, destacam-se atraso neuropsicomotor e deficiência mental grave, microcefalia e dismorfismos faciais, além do choro semelhante a um miado de gato em geral observado durante os dois primeiros anos de vida e determinado por alterações da laringe como alterações de parede e hipoplasia (199). Embora bem caracterizada clinicamente, há alguma variabilidade fenotípica, principalmente nos casos com translocação resultando em del(5p) e duplicação da região do outro cromossomo envolvido, pois o material em excesso poderia alterar o fenótipo clássico da síndrome (199).

Com o refinamento das técnicas de diagnóstico foi possível a identificação dos pontos de quebra envolvendo a região 5p terminal, bem como a correlação entre os genes envolvidos e as características fenotípicas observadas na síndrome. Segundo revisão de Mainardi *et al.* (199) a região 5p é rica em genes, sendo a perda da região 5p14 associada a DM moderada a grave, enquanto a região 5p15 é associada a características como choro atípico, microcefalia, alterações de fala e dismorfismos faciais (199).

Muitos indivíduos com deleção 5p são identificados pelo exame citogenético convencional, porém alguns podem não ser diagnosticados. Kondoh *et al.* (206) e Laczmanska *et al.* (207) salientam essa dificuldade, mostrando que análise por citogenética convencional e FISH com sondas específicas para a região podem não garantir um diagnóstico preciso. Tais autores sugerem a necessidade da técnica FISH *multiprobe* para um resultado mais preciso. Entretanto, é importante salientar o custo alto, bem como o trabalho e tempo dispendido para a realização desse procedimento. Nesse sentido, a técnica de MLPA pode ser utilizada como triagem em pacientes com suspeita clínica de deleções terminais com cariótipo normal (206,207).

Na técnica de MLPA, a região escolhida para o desenho da sonda é a 5p15.3, sendo utilizado o gene *PDCD6* como marcador no *kit* SALSA P036 (Tabela III, pág. 57), enquanto para o *kit* de confirmação SALSA MLPA P070 (Tabela VII, pág. 58)

foi escolhido o gene *CCDC127*, ambos adequados para a identificação de alterações na região 5p (Figura 43).

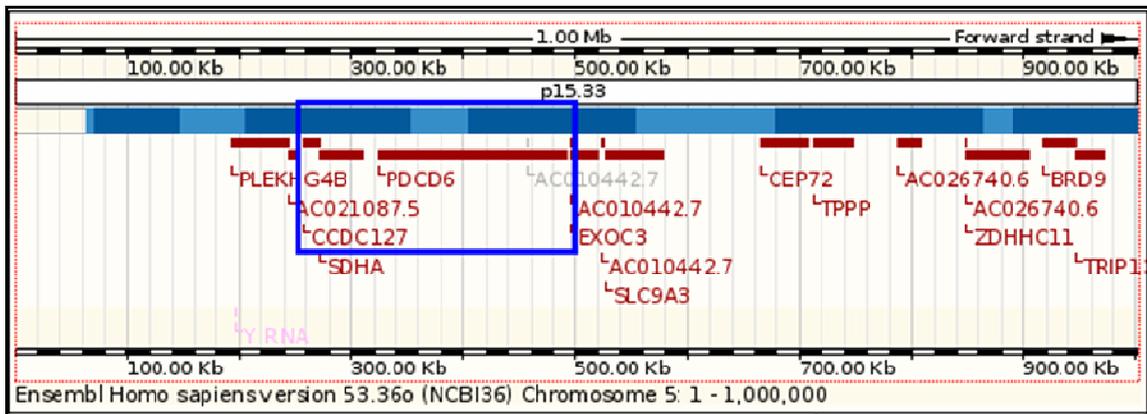


Figura 43 Localização dos genes *PDCD6* e *CCDC127* (cromossomo 5p), cujas seqüências foram utilizadas para a confecção das sondas 5p presentes nos kits SALSA MLPA P036 e P070, respectivamente (180).

Para a confecção da sonda 9p dos kits SALSA MLPA P036 e P070 foram escolhidos os genes *DMRT1* e *DOCK8* (em 9p24), respectivamente (Figura 44).

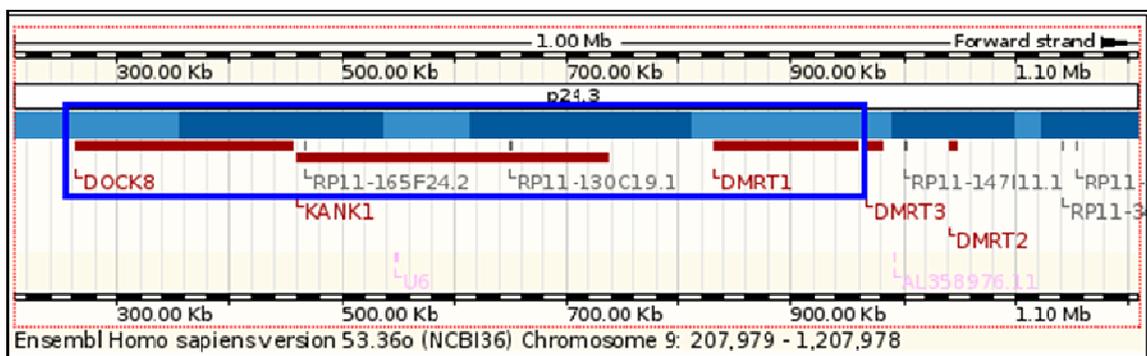


Figura 44 Localização dos genes *DMRT1* e *DOCK8* (cromossomo 9p), cujas seqüências foram utilizadas para a confecção das sondas 9p presentes nos kits SALSA MLPA P036 e P070, respectivamente (180).

O paciente em questão (P64), 8 meses, do sexo masculino, é o único filho de casal não consanguíneo, sem antecedentes familiares relevantes. A gestação transcorreu bem, apenas com relato de tabagismo (5 cigarros/dia) durante o primeiro

mês; peso ao nascimento de 2.250 g, comprimento de 45 cm, sendo observados sinais como choro atípico (similar a miado de gato), hipotonia, sucção débil, microcefalia, pregas epicânticas internas, filtro curto, comissuras bucais voltadas para baixo, palato alto, orelhas dismórficas, pescoço curto, mamilo supranumerário, luxação de quadril, clinodactilia de 5° dedo, prega palmar transversal única, hérnia inguinal, criptorquidismo e estreitamento do canal anal.

O exame de cariótipo foi normal, 46,XY, com resolução de 500 bandas por lote haplóide.

Entretanto, tendo em vista o fenótipo do paciente, com parte dos sinais sugestivos da SCDC, mas também outros sinais não anteriormente descritos nessa condição, foi indicada análise por MLPA. O resultado indicou um rearranjo interpretado como uma deleção terminal do cromossomo 5p e uma duplicação terminal do cromossomo 9p, com ambos os *kits* SALSA MLPA P036 e SALSA MLPA P070 (Figuras 45-48).

A associação de alteração subtelomérica em 5p com outras anomalias, envolvendo cromossomos como 1p, 4q, 6q, 7q, 10p, 15p, 18p, 18p, 21q, 22p, já foi descrita em diversos estudos (208,209,202,210,211,212,213).

Porém, a associação de alterações concomitantes em 5p e 9p, ou de rearranjos, como observado neste estudo, foi relatada em poucos trabalhos (214,215,216,90,91), sendo considerada rara.

A duplicação 9p foi descrita pela primeira vez em 1970 por Rethoré *et al.* (207). Embora houvesse o envolvimento de outro segmento cromossômico também com deleção e variação de tamanho da região duplicada, o quadro clínico inclui atraso do desenvolvimento, retardo mental, estatura baixa, microbraquicefalia, enoftalmia, nariz bulboso, orelhas dismórficas, comissuras bucais desviadas para baixo e mãos pequenas (218,219). Em parte desses casos, a região duplicada foi herdada de um genitor com translocação equilibrada e em um número menor ocorreu duplicação *de novo* (218).

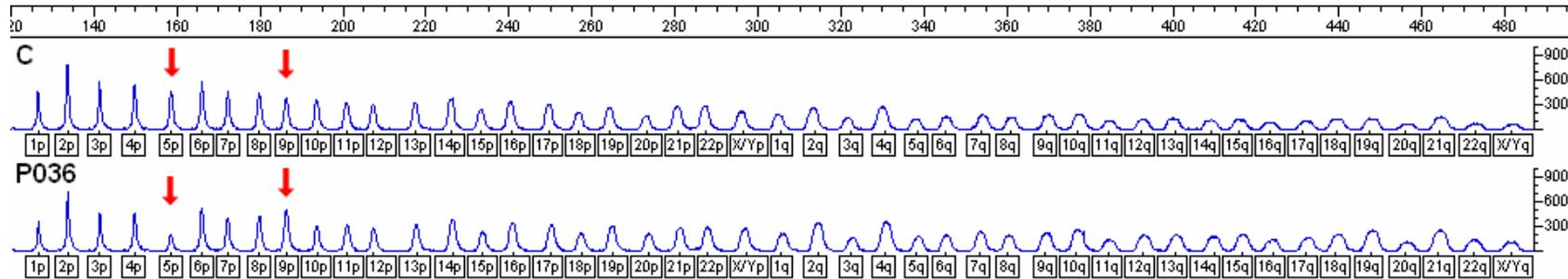


Figura 45 Gráfico de reação do caso P64 em comparação a reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P036, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

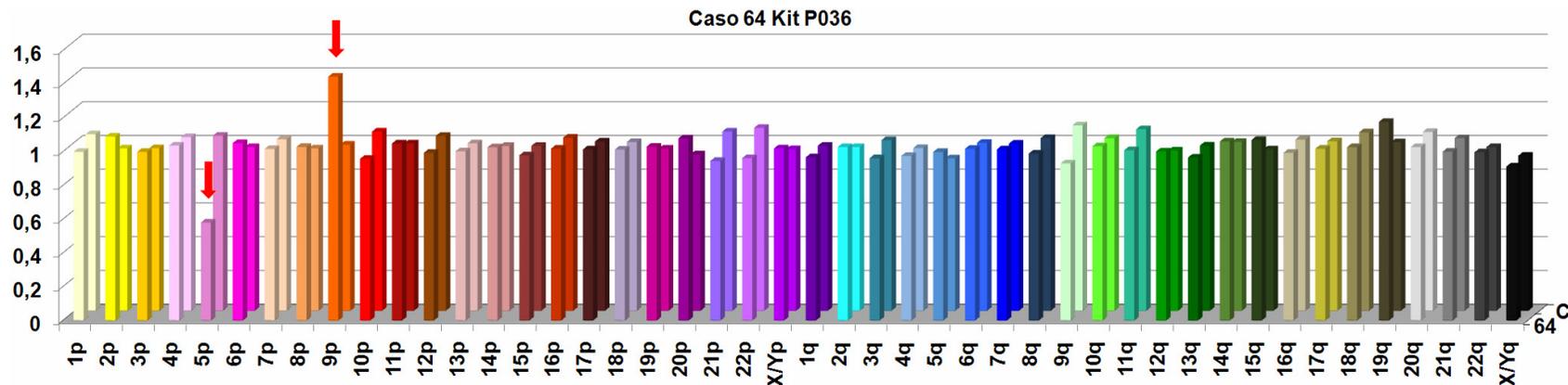


Figura 46 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P036 para o caso P64, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P036C DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

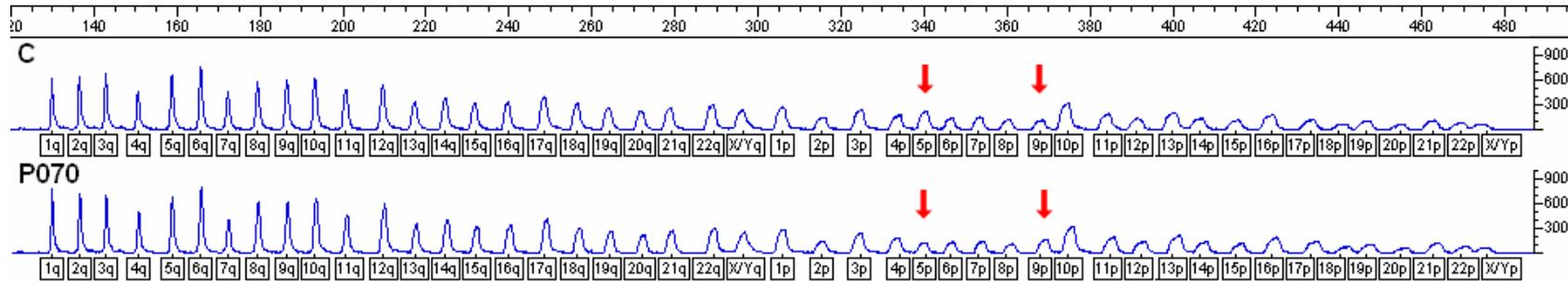


Figura 47 Gráfico de reação do caso P64 em comparação a reação controle sem alteração (C) para o *kit* SALSA MLPA P070, segundo o programa Genotyper® (*Applied Biosystems - Appliedera Corporation, Estados Unidos*).

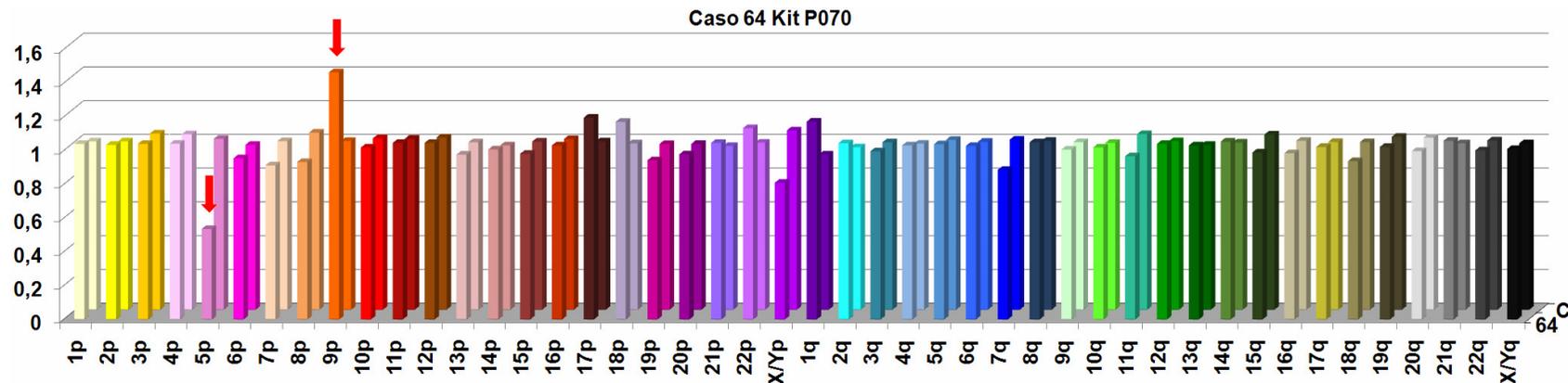


Figura 48 Gráfico do resultado de MLPA com o *kit* SALSA MLPA P070 para o caso P64, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise P070 DQ adaptive, do grupo NGRL-MANCHESTER.

Comparando-se as características do presente caso (P64) com descrição de outros indivíduos monossomia 5p, trissomia 9p e casos de rearranjo del(5p)/dup(9p), observa-se similaridade de sinais entre as duas condições, como demonstrado na Tabela X (199,202,215,216,218,219,220,221). Contudo, vale destacar que algumas não haviam sido registradas anteriormente, como luxação de radio e anomalias intestinais.

Tabela X Comparação entre as características clínicas encontradas nos pacientes com del(5p), dup(9p), rearranjo del(5p)/dup(9p) (casos 1 e 2) e no paciente deste estudo.

Características	del(5p)	dup(9p)	del(5p)/ dup(9p) caso 1	del(5p)/ dup(9p) caso 2	Caso
Retardo do desenvolvimento	+	+	+	+	+
Retardo mental	+	+	NA	+	NA
Microcefalia	+	+	+	NA	+
Braquicefalia	-	+	-	+	+
Hipertelorismo	+	+	+	NA	-
Enoftalmia	+	+	-	+	+
Fissura palpebral para baixo	+	NA	+	NA	-
Fissura palpebral para cima	NA	NA	-	NA	+
Pregas epicânticas	+	+	-	NA	+
Estrabismo	+	+	+	NA	+
Nariz proeminente / globoso	-	+	+	NA	-
Filtro curto	-	+	+	+	+
Comissuras bucais desviadas para baixo	+	+	-	+	+
Palato alto / arqueado / fenda palatina	+	+	-	NA	+
Micrognatia	+	-	+	NA	+
Orelhas dismórficas	+	+	+	NA	+
Pescoço curto	+	+	+	NA	+
Clinodactilia	+	+	-	NA	+
Hipoplasia de falanges	-	+	+	+	+
Prega palmar única	+	+	+	+	+
Prega única em 5º dedo	-	+	-	NA	+
Ecoliose	+	+	-	NA	-
Lordose	-	+	-	NA	-
Luxação dos quadris	-	+	NA	NA	+

Diástase de retos abdominais	NA	+	+	NA	+
Hérnia umbilical	-	+	+	NA	-
Hipoplasia inguinal	-	+	-	NA	-
Cardiopatía congênita	-	+	NA	NA	-
Malformações renais	+	+	+	NA	-
Agenesia do corpo caloso	-	+	NA	NA	-
Choro de miado de gato	+	-	+	NA	+
Hipotonia	+	-	+	NA	+
Criptorquidismo	+	+	+	-	+
Hérnia inguinal	-	+	NA	NA	+
Anomalias intestinais	-	+	NA	NA	+
Luxação do rádio	NA	NA	NA	NA	+
Mamilo supernumerário	NA	+	NA	NA	+

NA: Não avaliado; del(5p): Mainardi *et al.* (2001), Mainardi (2006), Schinzel (2001); del(9p): Muñoz *et al.* (2004), Schinzel (2001); caso 1: Dallapiccola *et al.* (1983); caso 2: Sigmund *et al.* (1986).

Com a possibilidade das alterações cromossômicas observadas no paciente P64 terem sido herdadas, salienta-se a necessidade de estudos mais específicos nos mesmos, utilizando, por exemplo, a técnica de FISH, tendo em vista a importância dessa informação para o processo de aconselhamento genético dessa família.

Quando a SCDC é atribuída à deleção 5p *de novo*, o risco de recorrência na irmandade do propósito é praticamente igual ao da população em geral; sendo, porém, bem mais alto quando se trata de translocação equilibrada familiar. Nessa situação, a chance de ocorrência de alterações não balanceadas na prole de indivíduos com translocação equilibrada envolvendo 5p- é dependente do ponto de quebra e estaria entre 8,7% e 18,8%, para genitores de ambos os sexos, sendo a análise dos mesmos necessária para o aconselhamento genético, que poderá incluir alternativas como diagnóstico pré-natal ou mesmo pré-implantacional (202).

Para a validação dos resultados identificados por MLPA foi então realizada a técnica de FISH no paciente e seus genitores, sendo confirmada a presença de apenas um sinal 5pter (sonda 189N21) e três sinais 9pter (sonda 43N6) (Figura 49) no primeiro, enquanto análise de ambos os genitores com as

mesmas sondas foi normal, em 50 células. Assim, o cariótipo do propósito passa a ser 46,XY.ish der(5)t(5p;9p) *de novo*.

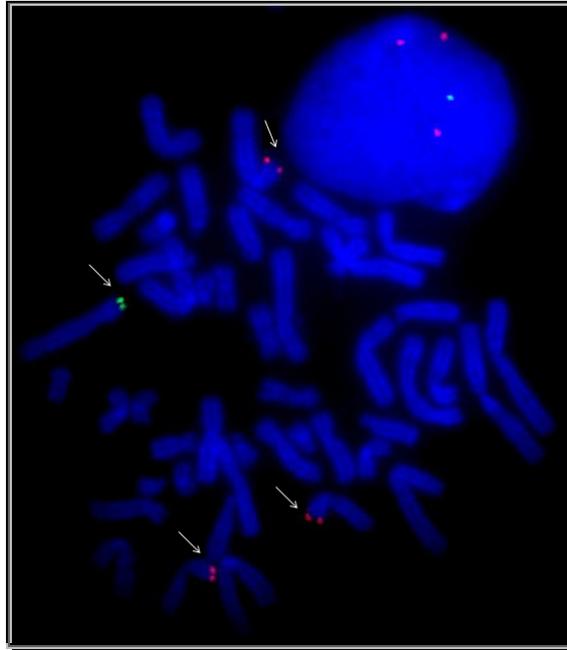


Figura 49. Resultado de FISH para o paciente P64 com sonda subtelomérica para a região 5p e 9p mostrando apenas um sinal 5pter (verde) e três sinais 9pter (vermelho) (setas). Tal achado corrobora com o resultado anômalo encontrado pela técnica de MLPA.

Para explicar esse achado, uma hipótese provável seria a de alteração pré-zigótica, por um erro na meiose ou associado a mosaicismo gonadal em um dos genitores, aspecto que não pode ser excluído no aconselhamento genético do casal, mesmo na ausência de registros de recorrência em relatos semelhantes na literatura (222).

5.4. Discussão da viabilidade do método como triagem para a detecção de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática.

Uma comparação entre as técnicas utilizadas como método de triagem para detecção de anormalidades cromossômicas indica que a técnica de MLPA é considerada mais adequada entre as já disponíveis. Com relação à técnica de *array*-CGH, o método de MLPA possui um número limitado de regiões (aproximadamente 50) estudadas por ensaio, porém, se comparado à primeira técnica, permite que 96 reações sejam testadas ao mesmo tempo, por um custo menor e utilizando equipamentos já disponíveis nos centros de pesquisa, mostrando-se mais adequada como método de triagem (95).

O custo para a realização da técnica também deve ser considerado na comparação dos métodos de FISH e MLPA em programas de triagem para rearranjos subteloméricos, pois o último tem custo menor, permite testar um número maior de regiões genômicas e dispensa a cultura celular. Entretanto, por tratar-se de método novo, exige que os resultados alterados sejam validados por outros considerados “padrão-ouro” de diagnóstico, como o FISH, por exemplo. De todo modo, ao utilizar o MLPA como teste de triagem, o número de casos a serem submetidos à técnica de FISH deve diminuir consideravelmente, viabilizando financeiramente a sua aplicação em programas de triagem (10).

As técnicas de MLPA e MAPH possuem como princípio a hibridização de sondas ao material genômico, sendo posteriormente amplificadas e analisadas comparativamente, para detecção de perda ou ganhos de material genômico. Entretanto, comparando a eficácia dos dois métodos, a de MLPA possui como vantagens a simplicidade e rapidez do resultado (120). Além disso, o MLPA é menos susceptível a contaminação, uma vez que não utiliza membrana para a hibridização das sondas ao material genômico, pois a reação ocorre inteiramente em tubos próprios para termociclador (133).

Erjavec-Škerget *et al.* (86), estudando rearranjos subteloméricos em crianças com DM idiopática, testaram a aplicabilidade de três métodos (FISH,

MLPA e *array*-CGH) no diagnóstico e concluíram que a técnica de FISH possui como vantagem a detecção de deleções e translocações balanceadas, além de mosaicismos, as quais não podem ser observadas pelos outros dois métodos. Contudo, o método é de custo mais elevado e demanda tempo maior para conclusão do caso. Já a técnica de *array*-CGH tem uma resolução maior, sendo capaz de detectar anormalidades não observadas pelo FISH, mas tem custo elevado e não é capaz de detectar rearranjos balanceados, como mencionado anteriormente (86). Ainda segundo esse estudo, todos os rearranjos subteloméricos observados pela a técnica de MLPA foram confirmados, havendo 100% de concordância entre os dois métodos (FISH e MLPA). Assim, apesar de exigir validação por outra técnica e não detectar rearranjos balanceados ou mosaicismos trata-se de um método eficiente e sensível que, quando combinado ao FISH para validação de resultados, pode ser utilizado na triagem de rearranjos subteloméricos (86).

Quanto aos critérios diagnósticos propostos por De Vries *et al.* (168) já foram aplicados em diversos estudos (64 e 10, entre outros), sendo que alterações subteloméricas com relevância clínica foram encontradas predominantemente em indivíduos que obtiveram pontuação superior a três. Segundo estudo conduzido por Koolen *et al.* (65), tal pontuação aumentaria em 12,4% a chance de diagnóstico, demonstrando a importância de uma pré-seleção dos pacientes.

No presente estudo, os pacientes foram selecionados a partir da aplicação desses critérios, sendo a pontuação apresentada no ANEXO 3. Por meio da técnica de MLPA, foram detectadas duas alterações subteloméricas que devem ser consideradas associadas ao fenótipo anômalo entre os 62 indivíduos estudados (3,2%). Porém, o número reduzido de pacientes analisados é insuficiente para uma conclusão quanto à eficiência de tais critérios na seleção de indivíduos para investigação de rearranjos subteloméricos.

De todo modo, pode-se ressaltar que foram encontradas alterações e, portanto, a técnica é apropriada, sugerindo que numa triagem de rotina para rearranjos subteloméricos em indivíduos com DM sua utilização é pertinente. Além disso, foram encontradas quatro alterações utilizando somente um *kit* de MLPA,

não observadas pelo *kit* de confirmação, enfatizando a necessidade do uso de dois *kits* desse método na rotina para a identificação de falsos positivos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A técnica de MLPA foi padronizada no CBMEG-Unicamp, estando em condições de ser aplicada no estudo de rearranjos subteloméricos em 62 indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática atendidos no Serviço de Genética Clínica do DGM-FCM-Unicamp.
- Nesses 62 indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática, em seis foram identificadas alterações, por meio do *kit* SALSA MLPA P036.
- Em quatro desses seis pacientes, incluindo dois irmãos, foi identificada a alteração del(12p), não confirmada pelo *kit* SALSA MLPA P070, sendo feito sequenciamento da região, o qual evidenciou um SNP já descrito pela base de dados SNP-Entrez NCBI nos quatro indivíduos.
- Nos dois casos restantes, foram identificadas as alterações subteloméricas [46,XY.ish del(1p36) e 46,XY.ish der(5)t(5p;9p)], ambas confirmadas pelo *kit* SALSA MLPA P070 e validadas pela técnica de FISH.
- No caso de der(5)t(5p;9p), foi realizada a técnica de FISH nos genitores, com resultado normal para ambos, definindo uma alteração *de novo*, sem registro na literatura.
- A partir dos itens levantados na padronização, o tempo de estocagem das reações em refrigerador foi maior que aquele aconselhado pelo fabricante; para os experimentos realizados na instituição, a quantidade de DNA utilizada foi um

pouco maior que a sugerida; não foi bem sucedida a utilização de protocolos com volumes reduzidos; a forma de normalização dos dados mais adequada para a análise dos resultados foi a combinação dos programas GeneScan®, Genotyper® e planilha específica para o *kit* ao invés do programa Coffalyser®, indicado pelo fabricante.

- Os resultados reforçam a observação de que a técnica de MLPA é uma alternativa viável e de custo relativamente baixo e, portanto, adequada para aplicação em programas de triagem de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou DM idiopática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S *et al.* Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference. *Am J Med Genet* 1997; 72:468-477.
2. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic Evaluation of Developmental Delay/Mental Retardation: An Overview. *Am J Med Genet Part C (Semin. Med. Genet.)* 2003; 117C:3-14.
3. APA. American Psychiatric Association, Committee on Nomenclature and Statistics. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* 1994; 4^o ed.
4. OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - Transtornos mentales. Glosario y Guia para su clasificación según la Novena Revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades, 1978.
5. Baralle D. Chromosomal aberrations, subtelomeric defects, and mental retardation. *The Lancet* 2001; 358:7-8.
6. Moeschler JB, Shevell M, and the Committee on Genetics. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006;117:2304-2316.
7. Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreëls F. The prevalence of mental retardation. A critical review of recent literature. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1997; 39:125-132.
8. Daily DK, Ardinger HH, Holmes GE. Identification and evaluation of mental retardation. *Am Fam Physician* 2000; 61:1059-67.
9. Vasconcelos MM. Retardo mental. *J Pediatr (rio J)* 2004; 80 (Supl 2):S71-S82.
10. Lam ACF, Lam STS, Lai KKS, Tong TMF, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochemistry* 2006; 39:196-202.
11. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J *et al.* MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 2006; 69:228-233.
12. Johnson CP, Walker Jr WO, Palomo-González SA, Curry CJ. *Mental Retardation: Diagnosis, Management, and Family Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2006.
13. IBGE – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2000. Características gerais da população. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. p.1-178 (<http://www.ibge.gov.br>).
14. Xu J, Chen Z. Advances in Molecular Cytogenetics for the Evaluation of Mental Retardation. *Am J Med Genet Part C (Semin. Med. Genet.)* 2003; 117C:15-24.
15. Opitz JM. Biologia e prevenção do retardo mental. In: Opitz, JM. Tópicos recentes de genética clínica. Tradução de Osvaldo Frota-Pessoa e Nicole S. Longhin Grosso. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1984. p.130-158.

Referências Bibliográficas

16. Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decoufle P, Hollowell JG. 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.
17. Winnepeninckx B, Rooms L, Kooy RF. Mental retardation: a review of the genetic causes. *Brit J Dev Disabil* 2003; 49:29-44.
18. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics* 2004; 113:e472-e486.
19. Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9:132-140.
20. Kabra M, Gulati S. Mental retardation. *Indian J Pediatr* 2003; Feb;70(2):153-158.
21. Raymond FL, Tarpey P. The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet.* 2006; Oct 15;15 Spec No 2:R110-116.
22. Rodríguez-Revenge B, Madrigal-Bajo I, Milà-Recasens M. Retraso mental de origen genético. *L. Rev Neurol* 2006; 43 (Supl 1): S181-S186.
23. Vogel F, Motulski AG. *Genética Humana. Problemas e Abordagens.* Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan Ltda. 2000, 684p. 3ªed.
24. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1959; 248:1721-1722.
25. Thompson & Thompson. *Genética Médica.* Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan Ltda. 2002, 387p. 6ªed.
26. Ahuja AS, Thapar A, Owen MJ. Genetics of mental retardation. *Indian J Med Sci,* September 2005; Vol. 59, No. 9.
27. Jorde LB, Bamshard MJ, White RL, Carey J. *Genética Médica.* Editora Elsevier Ltda. 2004, 440p. 3ªed.
28. Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet.* 2004; 7(2-3):76-94.
29. De Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. *J Med Genet.* 1998; Jul;35(7):579-589.
30. Scriver CR. Whatever happened to PKU? *Clin Biochem.* 1995; Apr;28(2):137-144.
31. Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman Syndromes: Sister Imprinted Disorders. *A J Med Genet* 2000; 97:136-146.
32. Buiting K, Grob S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, El-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman Syndromes: A Molecular Study of 136 Patients with an Imprinting Defect. *Am J Hum Genet.* 2003; 72:571-577.

Referências Bibliográficas

33. Borelina D, Engel N, Esperante S, Ferreira V, Ferrer M, Torrado M *et al.* Combined Cytogenetic and Molecular Analyses for the Diagnosis of Prader-Willi/Angelman Syndromes. *J B and Mol Bio* 2004; 37(5):522-526.
34. Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RB, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9:132-139.
35. Viot G, Gosset P, Fert S, Prieur M, Turleau C, Raul O *et al.* Cryptic subtelomeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am J Hum Genet Suppl* 1998; 63:A10.
36. Vorsanova S, Kolotil A, Sharonin V, Soloviev I, Yurov Y. FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (Suppl):A154.
37. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T *et al.* Subte chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999; 354:1676-1681.
38. Lamb A, Lytle C, Aylsworth A, Powell C, Rao K, Hendrickson M *et al.* Low proportion of subtelomeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Hum Genet* 1999; 65(Suppl):A169.
39. Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C *et al.* Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 1999; 36:405-411.
40. Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1356-1359.
41. Bonifacio S, Centrone C, Da Prato L, Scordo MR, Estienne M, Torricelli F. Use of primed in situ labeling (PRINS) for the detection of telomeric deletions associated with mental retardation. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93:16-18.
42. Borgione E, Giudice ML, Galesi O, Castiglia L, Failla P, Romano C *et al.* How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *J Med Genet* 2001; 38:E1.
43. Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C *et al.* A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:319-327.
44. Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrel S, Jung JH, Siu VM. Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 2001; 3:416-421.
45. Joly G, Lapierre J-M, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois M-C *et al.* Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 2001; 60:212±219.

Referências Bibliográficas

46. Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high resolution G-banding and FISH. *Hum Genet* 2001; 109:440±451.
47. Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A *et al.* Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 2001; 109:286-294.
48. Rosenberg MJ, Killoran CE, Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J *et al.* Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet* 2001; 109:311±318.
49. Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R *et al.* Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 2001; 38:417±420.
50. Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet* 2001;9:527-532.
51. Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M *et al.* Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 2002; 107:275-284.
52. Baker E, Hinton L, Callen DF, Aintree M, Dobbie A, Eyre HJ *et al.* Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 2002; 107:285-293.
53. Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezarati MM *et al.* Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet* 2002; 107:267-274.
54. Dawson AJ, Putnam S, Schultz J, Riordan D, Prasad C, Greenberg CR *et al.* Cryptic chromosome rearrangements detected by subtelomere assay in patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 2002; 62:488-494.
55. Helias-Rodzewicz Z, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kostyk E, Jakubow-Durska K *et al.* Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *J Med Genet.* 2002; Sep;39(9):e53.
56. Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JAL. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet* 2002; 39:790-795.
57. Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B. Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet* 2002; 111:31-39.
58. Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O *et al.* Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet* 2002; 39(4):266-270.

Referências Bibliográficas

59. Van Karnebeek CDM, Koevoets C, Sluiter S, Bijlsma EK, Smeets DFMC, Redeker EJ, *et al.* Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 2002; 39:546-553.
60. Hulley BJ, Hummel M, Wenger SL. Screening for cryptic chromosomal abnormalities in patients with mental retardation and dysmorphic facial features using telomere FISH probes. *Am J Med Genet* 2003; 117A:302–303.
61. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D *et al.* Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 2003; 5:28-34.
62. Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kazmierczak A, Stankiewicz P *et al.* Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit* 2004; 10:CR143-CR151.
63. Borck G, Rio M, Sanlaville D, Redon R, Molinari F, Bacq D *et al.* Genome wide screening using automated fluorescent genotyping to detect cryptic cytogenetic abnormalities in children with idiopathic syndromic mental retardation. *Clin Genet* 2004; 66:122-127.
64. Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 2004; 41:130-136.
65. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merckx GFM, Knoers NVAM, Kets M *et al.* Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; 41:892-899.
66. Kriek M, White SJ, Bouma MC *et al.* Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet* 2004; 41 (4): 249-255.
67. Li R, Zhao ZY. Two subtelomeric chromosomal deletions in forty-six children with idiopathic mental retardation. *Chin Med J* 2004; 117(9):1414-1417.
68. Novelli A, Ceccarini C, Bernardini L *et al.* High frequency of subtelomeric rearrangements in a cohort of 92 patients with severe mental retardation and dysmorphism. *Clin Genet* 2004; 66:30-38.
69. Pickard BS, Hollox EJ, Malloy MP, Porteous DJ, Blackwood DH, Armour JA *et al.* A 4q35.2 subtelomeric deletion identified in a screen of patients with co-morbid psychiatric illness and mental retardation. *BMC Med Genet.* 2004; Aug 13;5:21.
70. Rodríguez-Revenga L, Bádenas C, Sánchez A, Mallolas J, Carrió A, Pedrinaci S *et al.* Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 2004; 65:17- 23.
71. Rooms L, Reyniers E, Van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B *et al.* Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Human Mutation* 2004; 23:17-21.
72. Rooms L, Reyniers E, Van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Kooy RF. Screening for subtelomeric rearrangements using genetic markers in 70 patients with unexplained mental retardation. *Ann Genet.* 2004 Jan-Mar;47(1):53-59.

Referências Bibliográficas

73. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H *et al.* Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004; 41:241-248.
74. Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G *et al.* Subtelomere FISH in 50 Children With Mental Retardation and Minor Anomalies, Identified by a Checklist, Detects 10 Rearrangements Including a De Novo Balanced Translocation of Chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet* 2004; 128A:364-373.
75. Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke D, Jalal SM. Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet* 2005; 135A:28-35.
76. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A *et al.* FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Euro J Med Genet* 2005; 48:388-396.
77. Caliskan MO, Karauzum SB, Mihci E, Tacoy S, Luleci G. Subtelomeric chromosomal rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic features. *Genet Couns.* 2005;16(2):129-138.
78. De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM *et al.* Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2005 Oct;77(4):606-616.
79. Kok K, Dijkhuizen T, Swart YE, Zorgdrager H, Van der Vlies P, Fehrmann R *et al.* Application of a comprehensive subtelomere array in clinical diagnosis of mental retardation. *Eur J Med Genet* 2005; 48:250-262.
80. Moog U. The Outcome of Diagnostic Studies on the Etiology of Mental Retardation: Considerations on the Classification of the Causes. *American Journal of Medical Genetics* 2005; 137A:228-231.
81. Rosenberg C, Knijnenburg J, Chauffaille MJ, Brunon D, Catelani AL, Sloos W *et al.* Array CGH detection of a cryptic deletion in a complex chromosome rearrangement. *Hum Genet* 2005; 116:390-394.
82. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld N. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J. Med Genet* 2005;42:699-705.
83. Velagaleti GVN, Robinson SS, Rouse BM, Tonk VS, Lockhart LH. Subtelomeric Rearrangements in Idiopathic Mental Retardation. *Indian J Pediatr* 2005; 72 (8):669-678.
84. Cogulu O, Gunduz C, Karaca E, Onay H, Ozkinay C, Ozkinay F. Chromosomal rearrangements in children with idiopathic mental retardation using subtelomeric fluorescent in situ hybridization. *Genet Couns.* 2006;17(3):321-331.
85. Delague V, Souaid M, Chouery E, Depetris D, Sanlaville D, Mattei MG *et al.* Screening for subtelomeric rearrangements using automated fluorescent genotyping of microsatellite markers: a Lebanese study. *Euro J Med Genet* 2006; 49:117-126.

Referências Bibliográficas

86. Erjavec-Škerget A, Stangler-Herodež S, Zagorac A, Zagradišnik B, Kokalj-Vokač N. Subtelomeric Chromosome Rearrangements in Children with Idiopathic Mental Retardation: Applicability of Three Molecular-cytogenetic Methods. *Croat Med J.* 2006;47:841-850.
87. Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Méd* 2006; 147:295-300.
88. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesomepele J, Melotte C *et al.* Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J Med Genet* 2006; 43:625-633.
89. Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H *et al.* BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 2006; 140A:205-211.
90. Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Méd* 2006; 147:295-300.
91. Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D *et al.* 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* 2006, 43(6):478-489.
92. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, Van Luijk R, Scheers S *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet* 2006; 69:58-64.
93. Saugier-veber P, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, de La Rochebrochard C, Layet V, Drouot N. Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. *European Journal of Human Genetics* 2006; 14:1009-1017.
94. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, *et al.* Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet.* 2006; Sep;38(9):1038-1042.
95. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C *et al.* Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics* 2007; 8:9.
96. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA *et al.* The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:1850-1857.
97. Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen G-JB *et al.* Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: A new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:610-614.
98. Ruiters EM, Koolen DA, Kleefstra T, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N *et al.* Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. *Clin Genet* 2007; 72: 362-368.

Referências Bibliográficas

99. Wu Y, Jiang YW, Wang XZ, Wang HF, Wang JM, Yang YL *et al.* Detection of subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic mental retardation/developmental delay. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2007; Dec;45(12):906-911.
100. Park HK, Kim HJ, Kim HJ, Han SH, Kim YJ, Kim SH. Screening of Subtelomeric Rearrangements in 100 Korean Pediatric Patients with Unexplained Mental Retardation and Anomalies Using Subtelomeric FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) *J Korean Med Sci* 2008; 23: 573-578.
101. Shao L, Shaw CA, Lu X-Y, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR *et al.* Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: A study of 5,380 cases. *Am J Med Genet Part A* 2008; 146A:2242-2251.
102. Stegmann APA, Jonker LMH, Engelen JJM. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet* 51 2008; 93e105.
103. Stoeva RE, Grozdanova LI, Vermeesch JR, Kirchhoff M, Fryns JP, Ivanov IS *et al.* Clinical and molecular-cytogenetic studies of cryptic chromosome aberrations in individuals with idiopathic mental retardation and multiple congenital malformations. *Folia Med (Plovdiv)* 2008; Oct-Dec;50(4):55-62.
104. De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, Van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; 40:385-398.
105. McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Ann Rev Genet* 2000; 34:331-358.
106. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6622-6626.
107. Blasco MA, Gasser SM, Lingner J. Telomeres and telomerase. *Genes & Dev.*1999; 13: 2353-2359.
108. Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37(6):401-409.
109. Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu XL, Flint J *et al.* Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Nature* 2001; 409:948-951.
110. Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA *et al.* Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Human Molecular Genetics* 1997; 6(8):1305-1314.
111. Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U *et al.* Mapping and Initial Analysis of Human Subtelomeric Sequence Assemblies. *Genome Research* 2004; 14:18-28.
112. Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet* 2002; 3(2):91-102.

Referências Bibliográficas

113. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. Segmental duplications: Organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res.* 2001; 11:1005-1017.
114. Saccone S, De Sario A, Della VG, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4913-4917.
115. Mao R, Pevsner J. The use of genomic microarrays to study chromosomal abnormalities in mental retardation. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 2005; 11: 279-285.
116. Ramos-Fuentes F.J. Evaluación y diagnóstico del paciente con retraso mental de origen genético: protocolos estandarizados de evaluación clínica. *Rev Neurol* 2006; 42 (Supl 1):S93-98.
117. Dave BJ, Sanger WG. Role of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics in the Diagnosis of Genetic Imbalances. *Semin Pediatr Neurol* 2007; 14:2-6.
118. Guitart-Feliubadaló M, Brunet-Veja A, Villatoro-Gómez S, Baena-Díez N, Gabau-Vila E. Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosómicas diagnosticables en el paciente. *Rev Neurol* 2006; 42 (Supl 1):S21-S26.
119. Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merks G, Van Cleef B *et al.* High-Throughput Analysis of Subtelomeric Chromosome Rearrangements by Use of *Array-Based Comparative Genomic Hybridization*. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1269-1276.
120. Rooms L, Reyniers E, Kooyne RF. Subtelomeric Rearrangements in the Mentally Retarded: A Comparison of Detection Methods. *Human Mutation* 2005; 25:513-524.
121. Guerra M. FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). *Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ed.SBG 2004. p.133-144.
122. Rodríguez-Revenge L, Badenas C, Sánchez A, Mallolas J, Carrió A, Pedrinaci S *et al.* Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 2004; 65:17-23.
123. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20:207-211.
124. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004; 66:488-495.
125. Vissers LELM, Veltman JA, Van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Department Human Molecular Genetics* 2005; Vol. 14, Review Issue 2 R215-R223.
126. Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet.* 2006; Feb;14(2):139-148.

Referências Bibliográficas

127. Tyson C, Harvard C, Locker R, Friedman JM, Langlois S, Lewis ME *et al.* Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet Part A* 2005; 139A:173-185.
128. Toruner GA, Streck DL, Schwalb MN, Dermody JJ. An oligonucleotide based array-CGH system for detection of genome wide copy number changes including subtelomeric regions for genetic evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:824-829.
129. Zhang ZF, Ruivenkamp C, Staaf J, Zhu H, Barbaro M, Petillo D *et al.* Detection of submicroscopic constitutional chromosome aberrations in clinical diagnostics: a validation of the practical performance of different array platforms. *Eur J Hum Genet* 2008; 1-7.
130. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005; 42:699-705.
131. Stankiewicz P, Beaudet *al.* Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development* 2007; 17:182-192.
132. Armour JAL, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:605-609.
133. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Human Mutation* 2004; 23:413-419.
134. Patsalis PC, Kousoulidou L, Sismani C, Männik K. MAPH: from gels to microarrays. *Eur J Med Genet* 2005; 48 241-249.
135. Patsalis PC, Kousoulidou L, Männik K, Sismani C, Zilina O, Parkel S. Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization *Eur J Hum Genet* 2007; 15:62-172.
136. Kousoulidou L, Parkel S, Zilina O, Palta P, Puusepp H, Remm M *et al.* Screening of 20 patients with X-linked mental retardation using chromosome X-specific array-MAPH. *Eur J Med Genet* 2007; 50 399e410.
137. White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M *et al.* Comprehensive Detection of Genomic Duplications and Deletions in the DMD Gene, by Use of Multiplex Amplifiable Probe Hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:365-374.
138. White HE, Durston VJ, Harvey JF, Nicholas CP. Quantitative Analysis of *SRNP* Gene Methylation by Pyrosequencing as a Diagnostic Test for Prader–Willi Syndrome and Angelman Syndrome. *Cross. Clinical Chemistry* 2006; 52:6 1005-1013.
139. Akrami SM, Dunlop MG, Farrington SM, Frayling IM, MacDonald F, Harvey JF, Armour JA. Screening for exonic copy number mutations at *MSH2* and *MLH1* by MAPH. *Fam Cancer.* 2005;4(2):145-149.
140. Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet.* 2002; Nov;39(11):790-795.

Referências Bibliográficas

141. Schouten JP, Mcelgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12):e57.
142. Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. *Anal Chem*. 2008 Nov 8.
143. MRC-Holland b.v. (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 20/03/2009).
144. Lim YK, Lau PTC, Ali AB, Lee SC, Wong JE-L, Putti TC *et al*. Identification of novel BRCA large genomic rearrangements in Singapore Asian breast and ovarian patients with cancer. *Clin Genet* 2007; 71:331-342.
145. De Lellis L, Curia MC, Catalano T, De Toffol S, Bassi C, Mareni C *et al*. Combined Use of MLPA and Nonfluorescent Multiplex PCR Analysis by High Performance Liquid Chromatography for the Detection of Genomic Rearrangements. *Human Mutation* 2006; 27(10):1047-1056.
146. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A *et al*. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA) *Hum Genet* 2005; 117:92-98.
147. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics* 2005; 6(1):29-35.
148. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D *et al*. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *European Journal of Human Genetics* 2005; 13:1231-1234.
149. Lai KKS, Loa IFM, Tong TMF, Cheng LYL, Lama STS. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) *Clinical Biochemistry* 2006; 39:367-372.
150. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe Amplification. *Electrophoresis* 2008; 29:4627-4636.
151. Gaetzner S, Stahl S, Sürücü O, Schaafhausen A, Halliger-Keller B, Bertalanffy H *et al*. *CCM1* gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurg Rev* 2007; 30:155-160.
152. Jehee FS, Krepisch-Santos ACV, Rocha KM, Cavalcanti DP, Kim CA, Bertola DR. High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, MLPA and array-CGH. *J. Med. Genet*. 2008.
153. Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 2003; 40(12):907-12.

Referências Bibliográficas

154. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Kjaergaard S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis - experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 2008; 28:1119-1125.
155. Boormans EMA, Birnie E, Wildschut HI, Schuring-Blom HG, Oepkes D, Van Oppen CAC. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus karyotyping in prenatal diagnosis: the M.A.K.E. study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2008; 8:18.
156. Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI *et al.* High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet Part A* 2006; 140A:2786-2793.
157. Diego-Alvarez D, De Alba MR, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C *et al.* MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn* 2007; 27:765-771.
158. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ *et al.* Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*, 2005; 33(14):e128.
159. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular Diagnosis of Prader-Willi and Angelman Syndromes by Methylation-Specific Melting Analysis and Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Clinical Chemistry* 2006; 52(7):1276-1283.
160. Dikowa N, Nygrenc AOH, Schouten JP, Hartmanna C, Kramerb N, Janssen B. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: Comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and Methylation-sensitive MLPA. *Molecular and Cellular Probes* 2007; 21:208-215.
161. Buijs A, Krijtenburg PJ, Meijer E. Detection of risk- identifying chromosomal abnormalities and genomic profiling by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic lymphocytic leukemia *Haematologica* 2006; 91:1434-1435.
162. Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: A Rapid, Reliable, and Sensitive Method for Detection and Analysis of Abnormalities of 22q. *Human Mutation* 2006; 27(8):814-821.
163. Sivertsen A, Lie RT, Wilcox AJ, Abyholm F, Vindenes H, Haukanes BI *et al.* Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A:129-134.
164. Griffiths S, Thompson P, Frayling F, Upadhyaya M. Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years. *Experience Familial Cancer* 2007; 6:21-34.
165. Bendavid C, Dubourg C, Pasquier L, Gicquel I, Le Gallou S, Mottier S *et al.* MLPA Screening Reveals Novel Subtelomeric Rearrangements in Holoprosencephaly. *Human Mutation* 2007; 0:1-9.
166. Gürtler N, Egenter C, Bösch N, Plasilova M. Mutation analysis of the Cx26, Cx30, and Cx31 genes in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Acta Otolaryngol.* 2008; Oct;128(10):1056-1066.

Referências Bibliográficas

167. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, Mcghee JDR, Coffa J, Schouten J *et al.* Detection of Cryptic Subtelomeric Chromosome Abnormalities and Identification of Anonymous Chromatin Using a Quantitative Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Assay. *Human Mutation* 2005; 26(5):477-486.
168. De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID *et al.* Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38:145-150.
169. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalance in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genetics* 2006; 50:33-42.
170. Planilhas para análise dos kits de MLPA - Grupo Manchester. Disponível em: <http://www.ngrl.org.uk/Manchester/>
171. Araújo M, Sanches MR, Susuki LA, Guerra JRG, Farah SB, Mello MP. Molecular analysis of *CYP21* and *C4* genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1-13.
172. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989. Cold Spring Harbor: Book 1, 1.2–1.32 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
173. Chromas Lite Freeware. Disponível em http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html
174. Gene Runner for Windows. Disponível em: <http://www.generunner.net/>
175. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960; 20:613-6.
176. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:2934-2938.
177. Applied Biosystems. Protocolos dos programas Genescan, Genotyper e aparelho de eletroforese capilar. Disponível em <http://www.appliedbiosystems.com>
178. Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M. Subtelomeric Imbalances in Phenotypically Normal Individuals. *Human Mutation* 2007;0:1-10.
179. On Line Mendelian Inheritance In Man, OMIM (TM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
180. Ensembl Genome Browser. [acesso em 20/02/2009]. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000100084
181. Pub Med, Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
182. Baroncini A, Avellini C, Neri C, Forabosco A. Distal 12p deletion in a stillborn infant. *Am J Med Genet*. 1990; 36(3):358-60.
183. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*. 2000; 34:297-329.

Referências Bibliográficas

184. Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD *et al.* Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1200-1212.
185. Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG. Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2007; 145C:346-356.
186. Shaffer LG, Heilstedt HA. Terminal deletion of 1p36. *Lancet*. 2001 Dec;358 Suppl:S9.
187. Wu YQ, Heilstedt HA, Bedell JA, May KM, Starkey DE, McPherson JD *et al.* Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. *Hum Mol Genet*. 1999; Feb: 8(2):313-321.
188. Battaglia A. Del 1p36 syndrome: a newly emerging clinical entity. *Brain Dev* 2005;27:358-361.
189. Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA *et al.* Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 2003b 72:1200-1212.
190. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*. 1997; Sep; 61(3):642-650.
191. Reish O, Berry SA, Hirsch B. Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet*. 1995; Dec 4;59(4):467-475.
192. R. Redon, M. Rio, S.G. Gregory, R.A. Cooper, H. Fiegler *et al.* Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or “deletion with positional effect” syndrome? *J. Med. Genet*. 2005; 42:166e171.
193. Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA *et al.* Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet*. 2005; Feb; 13(2):139-149.
194. Kang SH, Scheffer A, Ou Z, Li J, Scaglia F *et al.* Identification of proximal 1p36 deletions using array-CGH: a possible new syndrome. *Clin Genet*. 2007; Oct;72(4):329-338.
195. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L *et al.* Further Delineation of Deletion 1p36 Syndrome in 60 Patients: A Recognizable Phenotype and Common Cause of Developmental Delay and Mental Retardation. *Pediatrics* 2008;121:404-410.
196. Giraudeau F, Taine L, Biancalana V, Delobel B, Journal H, Missirian C *et al.* Use of a set of highly polymorphic minisatellite probes for the identification of cryptic 1p36.3 deletions in a large collection of patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 2001; 38:121-125.
197. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P *et al.* Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5. *CR Acad Sci (D)* 1963; 257:3098 -3102.

Referências Bibliográficas

198. Cornish K, Bramble D. Cri du chat syndrome: genotype-phenotype correlations and recommendations for clinical management. *Dev Med Child Neurol* 2002; 44(7):494-497.
199. Mainardi PC. Cri du Chat syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1:33.
200. Niebuhr E: Antropometry in the Cri du Chat syndrome. *Clin Genet* 1979; 16:82-95.
201. Tullu MS, Muranjan MN, Sharma SV, Sahu DR, Swami SR, Deshmukh CT *et al.* Cri-du-chat syndrome: clinical profile and prenatal diagnosis. *J Postgrad Med* 1998; 44:101-104.
202. Cerruti Mainardi P, Perfumo C, Pastore G, Cali A, Guala A, Biroli E *et al.* Cri du Chat Syndrome. *Ital J Pediatr* 2001; 27:840-850.
203. Bocian E, Suchenek K, Obersztyn E, Nowakowska B, Mazurczak T. Recombination aneusomy of subtelomeric regions of chromosome 5, resulting from a large familial pericentric inversion inv(5)(p15.3q35.3). *J Appl Genet* 46(1) 2005, pp. 109-114.
204. Moreira LMA, De Carvalho AFC, Borja ALVF, Pinto PSP, Silveira A, De Freitas LM *et al.* Mosaic cri-du-chat syndrome in a girl with a mild phenotype. *J Appl Genet* 2008; 49(4) pp. 415-420.
205. Murru D, Boccone L, Ristaldi MS, Nucaro AL. Cri du chat mosaicism: an unusual case of partial deletion and partial deletion/ duplication of the short arm of chromosome 5, leading to an unusual cri du chat phenotype. *Genet Couns.* 2008; 19(4):381-386.
206. Kondoh T, Shimokawa O, Harada N, Doi T, Yun C, Gohda Y *et al.* Genotype-phenotype correlation of 5p-syndrome: pitfall of diagnosis. *J. Hum Genet.* 2005; 50(1):26-29.
207. Laczmanska I, Stembalka A, Gil J, Czernomazowicz H, Sasiadek M. Cri du chat syndrome determined by the 5p15.3->pter deletion-diagnostic problems. *Eur J Med Genet.* 2006 Jan-Feb; 49(1):87-92.
208. Qumsiyeh MB, Stevens CA. Two sibs with different phenotypes due to adjacent-1 segregation of a subtle translocation t(4;5)(p16.3;p15.3)mat. *Am J Med Genet.* 1993 Sep 1; 47(3):387-391.
209. Flaherty L, Moloney J, Watson N, Robson L, Bousfield L, Smith A. A case of monosomy 21 found to be an unbalanced de novo t(5p;21q) by fluorescence in situ hybridization. *J Intellect Disabil Res.* 1998 Jun; 42 (Pt 3):254-258.
210. Ensenauer R, Jalal S, Meyer R, Babovic-Vuksanovic D. Unbalanced cryptic 5p deletion/17p duplication identified by subtelomeric FISH in a family with a boy with chimerism and a balanced t(4;5). *Am J Med Genet A.* 2004 Feb 5;125A(1):86-91.
211. Drazinic CM, Ercan-Sencicek AG, Gault LM, Hisama FM, Qumsiyeh MB, Nowak NJ *et al.* Rapid array-based genomic characterization of a subtle structural abnormality: a patient with psychosis and der(18)t(5;18)(p14.1;p11.23). *Am J Med Genet A.* 2005 211. Apr 30;134(3):282-390.
212. Azman B Z, Akhir S M, Zilfalil B A, Ankathil R. Two cases of deletion 5p syndrome: one with paternal involvement and another with atypical presentation. *Singapore Med* 2008; 49(4):e9.

Referências Bibliográficas

213. De Carvalho AF, da Silva Bellucco FT, Kulikowski LD, Toralles MB, Melaragno MI. Partial 5p monosomy or trisomy in 11 patients from a family with a t(5;15)(p13.3;p12) translocation. *Hum Genet.* 2008; Nov;124(4):387-392. Epub 2008 Sep 7.
214. Monteleone P, Monteleone J, Sekhon G, Hamilton W, Volk SL, Grzegocki J *et al.* Partial trisomy 5 with a carrier parent t(5p-;9p+). *Clin Genet.* 1976; Apr;9(4):437-440.
215. Dallapicolla B, Chessa L, Brinchi V, Frontali M, Gandini E. Mating between two balanced translocation carriers in two unrelated families. *Hum Genet.* 1983; 65(2):165-168.
216. Sigmund J, Frisch H, Heinz-Erian P, Rhomberg K, Wegner RD. *Pediatr Padol. Cri du chat-syndrome in combination with partial trisomy 9 p.* 1986; 21(1):61-67.
217. Rethoré MO, Larget-Piet L, Berger R, Carpentier S, Cruveiller J, Dutrillau B *et al.* 4 cases of trisomy for the short arm of chromosome 9. Individualization of a new morbid entity. *Ann Genet* 1970; 13(4):217-232.
218. Haddad BR, Lin AE, Wyandt H, Milunsky A. Molecular cytogenetic characterisation of the first familial case of partial 9p duplication (p22p24). *J Med Genet* 1996; 33:1045-1047.
219. Fujimoto A, Lin MS, Schwartz S. Direct duplication of 9p22-p24 in a child with duplication 9p syndrome. *Am J Med Genet* 1998; 77:268-271.
220. Schinzel A. *Catalogue of Unbalanced Chromosomes Aberrations in Man.* 2^oed., Berlin; New York: de Gruyter, 2001.
221. Muñoz MSR, Fernández JLH, Puente B, Manjón-Cabeza RA, Grondonac FL. Trisomía 9p. *An Pediatr (Barc)* 2004; 61(4):336-339.
222. Gardner Mc K, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and genetics counseling.* Oxford University Press 2004, 577pp.

ANEXOS

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 10/01/07.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 629/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0505.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "TÉCNICA DE MLPA: UMA ALTERNATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO DE REARRANJOS SUBTELOMÉRICOS EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA MENTAL IDIOPÁTICA. IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO NO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho
INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/06

II - OBJETIVOS

Implantação da técnica molecular de MLPA no Laboratório de Genética Médica/FCM/UNICAMP.

III - SUMÁRIO

A seleção de indivíduos que constituirão a amostra será feita entre aqueles rotineiramente avaliados no Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica. Inicialmente serão estudados, para implantação da técnica de MLPA, serão avaliados pacientes com diagnóstico de anomalias cromossômicas já detectadas no laboratório por outros métodos. Para tanto, serão utilizados DNAs advindos do banco de DNA existente no Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP e de pacientes que vierem a ser atendidos durante o período de execução do trabalho. A seguir será realizado um estudo piloto entre pacientes com deficiência mental idiopática. Nos casos positivos será realizado o FISH.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto de Genética cujo material a ser utilizado é estocado em Banco já regulamentado pelo CEP. O TCLE pode ser dispensado no caso de análise de amostras estocadas e deverá ser utilizado nas amostras prospectivas. Projeto elaborado segundo as normas do CEP.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Extraordinária do CEP/FCM, em 30 de outubro de 2006.


Prof. Dr. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas
Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: TÉCNICA DE MLPA: UMA ALTERNATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO DE REARRANJOS SUBTELOMÉRICOS EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA MENTAL IDIOPÁTICA. Implantação do Método no Departamento de Genética Médica da FCM-UNICAMP.

Responsáveis: Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho, Maricilda Palandi de Mello e Antonia Paula Marques de Faria.

Eu entendo que eu ou meu filho (a) fui (foi) convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pessoas com deficiência mental ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor de origem não esclarecida. O objetivo geral do estudo é investigar rearranjos subteloméricos nesses indivíduos pela técnica molecular chamada MLPA, que consiste em identificar pequenas alterações nas partes terminais dos cromossomos, próximas às regiões chamadas de telômeros.

Diversos estudos realizados em outros países demonstraram a eficiência dessa técnica para o diagnóstico de alguns casos de deficiência mental de origem não conhecida. Assim, com a implantação da técnica no Serviço de Genética Clínica da UNICAMP é possível o oferecimento para os pacientes na investigação da deficiência mental, com perspectiva de conclusão de seu diagnóstico. Para tanto, o Serviço de Genética Clínica está realizando um estudo piloto envolvendo a técnica de MLPA e pacientes com deficiência mental sem origem esclarecida.

Caso aceite participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será coletada uma amostra de sangue venoso (10 a 15ml, o equivalente a uma colher de sopa) do meu filho(a), e quando necessário minha e de meu cônjuge. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar tal procedimento.

A única vantagem que poderei ter será de conhecer uma possível alteração nos cromossomos do meu filho (a) ou mesmo no meu, que poderá estar relacionada ao problema que ele (a) apresenta. Fui informado (a) que se for detectada alguma alteração, serei imediatamente comunicado (a), sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a FCM-UNICAMP, na pessoa da Dra. Antonia Paula Marques de Faria, do Departamento de Genética Médica, nos tels. (19) 3521.8908 ou 3521.8907.

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. O sigilo será mantido em todo o estudo, a partir da utilização de um número de código para a identificação dos

indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/UNICAMP e que qualquer outro projeto que pretenda utilizá-lo, deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Eu estou ciente que a minha participação neste projeto de pesquisa não me acarretará nenhuma despesa, já que a coleta de material será realizada em minhas consultas regulares à Unicamp.

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação ou de minha família no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que minha família recebe atualmente ou venha a receber no futuro no HC-UNICAMP.

Em caso de recurso ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (19) 3521.8936.

Eu confirmo que a Bióloga Carolina Rodrigues Lincoln de Carvalho (ou o(a) Dr.(a) _____) me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Eu concordo que o DNA de minha família seja estocado
Eu não concordo que o DNA de minha família seja estocado

Nome

RG: _____

Nome do responsável / Assinatura / Data

Responsável e data da coleta: _____

Responsável pelo recebimento de resultado: _____

Modo de envio do resultado: _____

Telefone e/ou e-mail do responsável pelo recebimento de resultado: _____

REQUISIÇÃO DE EXAME

Data: _____
Nome do Paciente: _____
DGM: _____
HC: _____
Data de Nascimento: _____
Sexo: _____
Nome do pai: _____
Nome da mãe: _____
Tipo de exame: Molecular MLPA () Citogenético FISH ()
Quantidade de material: _____

Informações clínicas e história familiar:

Nome do Paciente: _____ DGM: _____

Critérios para seleção de pacientes com rearranjos teloméricos submicroscópicos (adaptada de De Vries *et al.*, 2003).

Dados	Pontuação
História familiar de DM: → Distribuição sugestiva de herança monogênica. (1) → Incompatível com herança monogênica (incluindo fenótipos diferentes). (2)	
Atraso de crescimento pré-natal (2)	
Anomalias de crescimento pós-natais (para cada uma das seguintes 1 ponto [máx. 2]): → Microcefalia (1), Baixa estatura (1); → Macrocefalia (1), Estatura elevada (1)	
Dois ou mais dismorfismos faciais → Destaque para hipertelorismo, anomalias nasais e auriculares. (2)	
Dismorfismos não-faciais e anomalias congênitas (para cada uma 1 ponto [máx.2]): → Destaque para anomalias em mãos (1), cardíacas (1), hipospadia (1), criptorquidia (1).	

Outras informações relevantes: _____

ANEXO 3: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES AVALIADOS

Caso	Sexo	Aspectos fenotípicos	Pontuação segundo De Vries (168)	Resultados
P1	F	RDNPM, déficit cognitivo, convulsões, hipoacusia, cardiopatia congênita, face triangular, implantação baixa dos cabelos em fronte e nuca, fissuras palpebrais oblíquas para cima, cílios alongados, orelhas rodadas posteriormente, nariz com base alargada, pequeno e com narinas antevertidas, <i>philtrum</i> curto, lábios volumosos, comissuras labiais para baixo, má oclusão dentária, palato ogival/estreito, hipertricose em dorso, mancha café com leite de bordos irregulares em dorso, clinodactilia de 4º e 5º dedos, hipoplasia de falange distal de 5º dedo, braquidactilia de artelhos, hálux alargado e pés planos.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P5	M	Atraso leve da fala, movimento estereotipado de mãos, distúrbio de comportamento com traços autistas, olhos amendoados com fendas palpebrais oblíquas para cima, face levemente alongada, lábio superior fino, hiperextensibilidade articular discreta.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P9	M	RDNPM, hidrocefalia, alteração oftalmológica, hipoacusia e criptorquidia, macrocefalia, hipoplasia malar, melanose conjuntival, retrognatia, má oclusão dentária, manchas hiperocrômicas em palato duro e face lateral esquerda da língua, aumento da distância intermamilar, assimetria escapular e de membros inferiores, cicatriz em região epigástrica, clinodactilia em 5º dedo das mãos, cúbito valgo, testículos tópicos e assimétricos e nevos pigmentados em tronco e coxa direita.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P10	M	RDNPM, agitação psicomotora, agressividade, estatura elevada, occipital plano, orelhas proeminentes, olhos de localização mais profunda, frontal alto, mandíbula proeminente, sulco mentoniano, palato alto, cúbito valgo, testículos com 25cm ³ , sem sulcos plantares e/ou hiperextensibilidade articular.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P12	M	Implantação baixa e em V de cabelos na fronte, bochechas proeminentes, fendas palpebrais para baixo, aversão ao contato	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		ocular, retrognatismo, palato alto, incisivos centrais proeminentes, hipoplasia de metacarpianos, 4º e 5º dedos afilados, hiperextensibilidade articular discreta, dedos fusiformes, obesidade centrípeta, hipotonia leve, alteração de coordenação motora fina, fala e comportamento.		
P14	F	Microcefalia aparente, espessamento de sutura metópica, sugerindo trigonocefalia, orelhas dismórficas e algo proeminentes, fendas palpebrais desviadas para cima, epicanto interno bilateral, nariz de base alargada, com narinas antevertidas, aumento de distância intermamilar, fóvea coccígea, clinodactilia de 5º dedos, dedos mantidos em flexão, polegares adutos, prega palmar transversal única completa à direita e incompleta à esquerda, dedos dos pés hipoplásicos e com aparente sindactilia em 2º e 3º dedos, hipoplasia de pequenos lábios, manchas azuis em grande parte da região dorsal, hipertonia e hidrocefalia.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P15	F	RDNPM, face triangular, orelhas proeminentes, nevos pigmentados, fronte alta, fendas palpebrais estreitas, nariz com ponta levemente achatada, lábio superior fino, dentes serrilhados, palato alto, escoliose tóraco-lombar dextro côncava, polegar esquerdo com pigmentação anômala e discretamente alargado, aumento da distância entre 1º e 2º artelhos e lentigos.	8	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P16	M	Hipoplasia malar, orelhas inclinadas, em abano, sinofre com sobranceira espessa e arqueada, fendas palpebrais oblíquas para cima e alongadas, ptose palpebral, cílios longos, microretrognatismo, protusão maxilar, palato ogival, hipertrofia gengival (arcada superior), escoliose, excesso de pregas em falange proximal de 3º e 4º dedos das mãos, nevos pigmentados.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P17	F	RDNPM, refluxo gastro-esofágico, fala não desenvolvida.	0	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P18	M	RDNPM, hiperatividade, traços autistas, face triangular, implantação baixa dos cabelos em fronte e nuca, cílios alongados, hipertelorismo, orelhas de implantação baixa, dismórficas e rodadas posteriormente, nariz de implantação baixa com base alargada, comissuras labiais para baixo, retrognatismo, hipertricose em dorso, clinodactilia de 2º a 5º quirodáctilos e de 3º a 5º artelhos, camptodactilia de 2º a 5º dedos de mãos e pés, sindactilia cutânea discreta de 2º e 3º artelho, háluces	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		alargados, longos e com distância aumentada entre esses e os segundos artelhos.		
P19	F	RDNPM, <i>philtrum</i> naso-labial apagado, lábio superior fino, palato alto, aumento da distância intermamilar, dedos das mãos de aspecto fusiforme, hipoplasia de falange média de 5º dedos das mãos, clinobraquidactilia de 5º dedo da mão esquerda, camptodactilia de 5º dedo da mão direita, tecido celular subcutâneo abundante, hiperidrose em mãos e pés.	0	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P20	F	RDNPM, macrocefalia, frontal levemente alto, redemoinho frontal, face alongada, hipoplasia malar, orelhas em abano, pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para cima, nariz bulboso, ponte baixa, columela larga, ponta para baixo, <i>philtrum</i> longo, palato ogival, má oclusão dentária, hipoplasia de metacarpianos (4º e 5º dedos), distância aumentada entre hálux e 2º artelhos, cúbito valgo, alteração na pigmentação.	-	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P21	M	RDNPM, distúrbio de comportamento com traços autistas, auto e hetero-agressividade, brinca com objetos pouco usuais, não interage com outras crianças ou com adultos, não fala palavras e apenas emite sons, epilepsia, macrocefalia, implantação baixa e em tridente dos cabelos em nuca, frontal abaulado, cílios longos e narinas antevertidas, cicatrizes de mordedura em mãos.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P22	M	RDNPM principalmente de fala, dificuldade escolar, epilepsia, heteroagressividade ocasional, hérnia umbilical, palato levemente alto, cicatriz periumbilical, clinodactilia de 5º dedo das mãos e dois sulcos plantares.	1	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P23	M	RDNPM, dolicocefalia, espessamento de sutura metópica, retração bitemporal de cabelos, implantação alta de cabelos na frente, orelhas grandes, hipertelorismo, fendas palpebrais alongadas e com eversão no terço distal, cílios longos, ponte nasal para baixo, columela curta, <i>philtrum</i> curto e bem marcado, lábio superior em arco de cupido, palato alto, aumento da distância intermamilar, tórax escavado, mamilo esquerdo invertido, fôvea coccígea, sulco plantar.	-	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P24	M	RDNPM, fala pouco desenvolvida, não anda sem auxílio, tônus diminuído e sucção débil em período neonatal, suspeita de deficiência auditiva, refluxo gastro-esofágico, microbraquicefalia, occipital plano,	7	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		implantação baixa de cabelos na fronte, orelhas em abano e dismórficas, sinofre, epicanto discreto, estrabismo convergente, cílios longos, base nasal alargada, ponte alta, hipoplasia malar, microrretrognatia, comissuras bucais desviadas para baixo, <i>philtrum</i> naso-labial curto, aumento da distância intermamilar, assimetria torácica, fóvea coccígea, hipoplasia de 1º metacarpo bilateralmente, mancha hipocrômica em pescoço.		
P25	M	RDNPM, estrabismo, constipação intestinal importante com necessidade de clister ocasional, hipoplasia malar leve, cílios longos, olhos amendoados, estrabismo convergente leve em olho direito, orelhas em abano e com implantação baixa, narinas discretamente antevertidas, retrognatismo leve, lábio inferior fino, mandíbula frequentemente aberta, testículos pré-púberes.	-	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P26	M	RDNPM, epilepsia, frontal alto, implantação alta e em V de cabelos na fronte, orelhas de implantação mais baixa, ponte nasal baixa e base alargada, palato ogival, assimetria torácica leve, com hemitórax esquerdo um pouco menor que o direito, incluindo mamilos, clinodactilia de 2º dedos, mãos frouxas, acavalgamento discreto de dedos dos pés, hipertelorismo.	7	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P27	F	RM, frontal alto, órbitas mais fundas, com excesso de tecido subcutâneo peripalpebral, nariz com ponta bulbosa, lábios finos, limitação de prono-supinação dos antebraços, hipoplasia discreta de 4º e 5º metacarpianos, clinodactilia de 5º dedos e aumento da distância entre 1º e 2º dedos dos pés, sopro sistólico, ecolalia.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P28	M	RDNPM grave, frontal alto, face alongada, hipotonia, clinodactilia de 5º leve, excesso de pregas, hiperextensibilidade em mãos, escroto em cachecol, manchas arroxeadas na base do pênis, distúrbio de comportamento, hiperatividade, sintomas autísticos.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P29	F	RDNPM, braquicefalia, face achatada, fendas palpebrais oblíquas para cima, epicanto, língua protusa e fissurada, palato estreito e ogival, micrognatia, orelhas dismórficas, pescoço curto, pele redundante no pescoço, cardiopatia, mãos pequenas e largas, clinodactilia de 5º dedos.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P30	M	RDNPM, dificuldade de aprendizagem importante, refluxo gastroesofágico, hérnia umbilical corrigida aos 5 anos, implantação	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		baixa dos cabelos em nuca, cabelos avermelhados, fendas palpebrais oblíquas levemente para baixo, epicanto e telecanto bilateral, leve hipoplasia malar, raiz nasal baixa e narinas antevertidas, discreto prognatismo, cicatriz em linha alba, clinodactilia leve de 5º dedos, hipoplasia ungueal generalizada em todos os artelhos, mais intensa em 5º artelhos bilateralmente.		
P31	M	RDNPM, occipital plano, implantação de cabelos baixa na nuca esboçando um tridente, hipoplasia malar, nariz de base alargada com ponta bulbosa, prognatismo, lábio inferior volumoso, peito escavado, hipertelorismo mamilar, broto mamário bilateral, fôvea coccígea, mãos com alargamento das falanges distais dos dedos e com hiperextensibilidade articular, pés valgos, mancha hipocrômica em transição epigástrico / hipocôndrio direito.	8	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P32	M	RDNPM, occipital proeminente, implantação baixa de orelhas, hipertelorismo, fendas palpebrais estreitas, micrognatia, <i>philtrum</i> longo, maxila proeminente, aumento da distância intermamilar, tufo de pelos em região sacral, pregas palmares anômalas, polegar alargado e de implantação proximal, acavalgamento de 3º e 4º artelhos, sulco plantar entre hálux e 2º artelho, pé plano, calcâneos proeminentes, limitação discreta de abertura coxo-femoral, tecido celular subcutâneo escasso, cardiopatia.	9	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P33	F	Distúrbio psiquiátrico, excesso de pregas palmares e prega palmar incompleta à esquerda, abaulamento oval em occipital à esquerda, estrabismo divergente, filtro longo, lábio superior fino, palato alto, orelhas proeminentes.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P34	M	RDNPM, implantação de cabelos em V na frente, retração biparietal, face triangular, orelhas de implantação baixa e inclinadas, fendas palpebrais, hipoplasia de 4º e 5º metatarsianos, criptorquidia bilateral, hipotonia.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P35	M	RDNPM, miopia, enurese noturna, hipertelorismo, implantação baixa dos cabelos em frente, ptose palpebral discreta, orelhas levemente em abano, raiz nasal alargada, narinas antevertidas, lábios finos, hipoplasia de 4º e 5º metacarpianos à esquerda e de 5º à direita, háluces alargados, baqueteamento terminal de artelhos, escroto levemente em cachecol, ausência de hipospadia, estágio puberal de	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		Tanner P1G1, agressividade.		
P36	M	RDNPM, principalmente da fala, tônus diminuído no período neonatal, dificuldade escolar, autoagressividade ocasional, psoríase iniciada aos seis anos, miopia, adenoidectomia aos oito anos, macrosomia, face quadrada, hipoplasia malar, hipertelorismo, sobrancelhas rarefeitas, base nasal alargada, <i>philtrum</i> naso-labial curto, palato alto, hipoplasia de 4º e 5º metacarpos, pé plano, testículos com volume de 8cm ³ , pêlos pubianos em estágio puberal P1, lesões cutâneas em face.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P37	M	RDNPM, hiperatividade, distúrbios de comportamento, traços autistas, evita contato visual, heteroagressividade, ecolalia, brinca com objetos pouco usuais, atração por água, movimentos repetitivos e estereotipados, face alongada com prognatismo discreto, cílios longos, orelhas proeminentes, má oclusão dentária, hiperextensibilidade leve em dedos, testículos pré- púberes.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P39	M	RDNPM, principalmente da fala, dificuldade de aprendizado, agitação psicomotora e gestos repetitivos, dificuldade escolar, comportamento agitado, gestos repetitivos, autoagressividade, face alongada, dismorfismo auricular e sinofre discretos.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P40	M	RDNPM, implantação alta de cabelos na frente, face um pouco mais alongada, orelhas ligeiramente em abano, retrognatia, sulcos plantares marcados, hiperextensibilidade em pequenas articulações de mãos, testículos pré-púberes.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P41	F	RDNPM principalmente de fala, voz fanhosa, espessamento metópico leve, fovea pré-auricular bilateral, orelhas inclinadas e de implantação baixa, pregas anômalas em região posterior do lóbulo (semelhante ao pai), epicanto, sinofre discreta, nariz com ponte ampla e ponta bulbosa, filtro naso-labial curto, retrognatia, úvula bífida, cabelos de implantação baixa na frente e na nuca, prega transversal única bilateral e clinodactilia de 5º dedo.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P42	M	RDNPM, principalmente de fala, obesidade desde os 5 anos, sem compulsão alimentar, hipertrofia de adenóides, baixa implantação de cabelos em nuca, epicanto discreto, fendas palpebrais curtas e para cima, ptose leve, cílios levemente alongados, lábios finos, <i>philtrum</i> curto, incisivos proeminentes, hipoplasia de 4º e 5º metacarpianos, prega palmar incompleta bilateral, aparente braquidactilia de dedos em	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		mãos, acavalgamento leve de 2º sobre 1º e 3º artelhos, pés planos.		
P43	M	Orelhas discretamente em abano, hélices superiores levemente desdobradas e pontudas, fenda palpebral alongada, ptose palpebral à esquerda, discreta eversão do terço distal de pálpebra direita, cílios longos, lábio inferior evertido, <i>philtrum</i> naso-labial curto, palato alto, base nasal alargada, discreta hipoplasia de 4º e 5º metacarpianos, dedos fusiformes, dificuldades de linguagem.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P44	F	RDNPM, microcefalia, face triangular, palato alto, lábios arqueados, clinodactilia de 5º dedos.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P45	F	RDNPM, frontal alto e algo abaulado, implantação alta de cabelos na fronte, estrabismo divergente, comissuras bucais desviadas para baixo, <i>philtrum</i> pouco marcado, dentes em mau estado de conservação, dedos longos, pés planos com calcâneo proeminente, clitoromegalia aparente, musculatura algo hipotrófica e hipotônica.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P46	M	RDNPM, macrocefalia, frontal largo, alto, cílios longos, queixo pontudo, hipotonia muscular, hipoplasia malar, fendas palpebrais oblíquas para cima, epicanto, raiz nasal baixa, pescoço curto, mãos pequenas e largas.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P47	M	RDNPM, dificuldade de aprendizagem.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P48	M	Occipital plano, face achatada, e alongada, implantação baixa de cabelos na fronte, retração bitemporal, orelhas em abano, sinofre, hipertelorismo, fendas palpebrais para cima, sobrancelhas arqueadas com alargamento lateral, cílios bem longos, nariz proeminente, <i>philtrum</i> curto, palato alto, peito escavado, clinodactilia.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P49	M	RDNPM, dificuldade escolar, face alongada, orelhas em abano, pregas epicânticas, palato alto, verrugas em mãos.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P50	M	RDNPM, orelhas proeminentes, nariz com ponta bulbosa, <i>philtrum</i> apagado, clinodactilia, calcâneos proeminentes, inversão peno-escrotal leve, hiperextensibilidade articular, hemangioma em ombro esquerdo de 0,5 cm, hiperatividade.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P51	M	RDNPM, distúrbio de comportamento, aversão ao contato visual, movimentos repetitivos, ecolalia, hiperatividade, heteroagressividade, face triangular alongada, orelhas de implantação limítrofe, com lóbulo e porção superior antevertidos e dismórficas, cílios longos, ponte nasal fina e deprimida, filtro levemente longo, clinodactilia de 5º dedos,	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		prega palmar incompleta bilateral, hiperextensibilidade articular em dedos, cotovelos e joelhos.		
P52	M	RDNPM, convulsão, retração bitemporal discreta, face alongada, hipoplasia malar, orelhas em abano, aparente hipertelorismo, discreto retrognatismo, palato ogival, cintura escapular estreita, diástase de retos abdominais, distribuição ginecóide de gordura corporal.	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P53	M	RDNPM, macrocefalia, frontal alto, face alongada, dismorfismos auriculares, epicanto, telecanto, fendas palpebrais estreitas, hipoplasia malar, prognatismo, <i>philtrum</i> naso-labial curto, aumento da distância intermamilar.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – del(12p) MLPA <i>kit</i> P070 – sem alteração Sequenciamento – SNP rs 60220187
P54	M	RDNPM, hipertelorismo, macrocefalia, occipital proeminente, frontal abaulado, orelhas pequenas, epicanto, raiz nasal alargada, incisivos centrais com diastema e proeminentes, clinodactilia de 5º dedos, inversão penoescrotal, área de hipopigmentação em abdome de 2 cm de diâmetro, manchas café com leite, hiperatividade.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P55	M	RDNPM, hipotrofia muscular, mãos e pés longos, fronte alta e abaulada, occipital proeminente, implantação de cabelos alta na fronte e na nuca, hipoplasia malar, fendas palpebrais oblíquas pra baixo, sobrancelhas levemente escassas, hérnia umbilical, prega palmar única, camptodactilia de 5º dedo a esquerda, pés com clinodactilia de 5º dedo à esquerda, discreta zigodactilia entre 2/3 dedos, calcâneo proeminente, hiperatividade.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P56	F	RDNPM, principalmente da fala, dificuldade de aprendizado, sinofre discreta, clinodactilia em 5º dedo das mãos, limitação da extensão dos dedos das mãos, cúbito valgo, tecido celular subcutâneo escasso, aumento leve de pilificação em dorso e em membros superiores.	2	MLPA <i>kit</i> P036 – del(12p) MLPA <i>kit</i> P070 – sem alteração Sequenciamento – SNP rs 60220187
P57	M	RDNPM, principalmente de fala, atraso do fechamento da fontanela, estrabismo convergente bilateral, convulsão, braquicefalia, occipital plano, frontal alto, abaulado, implantação alta de cabelos na fronte, hipoplasia malar, face arredondada, bochechas proeminentes, orelhas de implantação baixa, epicanto, estrabismo convergente, ponte nasal levemente deprimida, comissuras bucais desviadas para baixo, filtro curto, palato alto, hérnia inguinal à direita, acavalgamento de 2º artelho à direita, dedos dos pés mais alargados, pés planos.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – del(1p36) MLPA <i>kit</i> P070 – del(1p36) FISH – del(1p36)
P58	M	RDNPM, hiperatividade, fronte ampla com sutura metópica levemente	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		proeminente, implantação alta de cabelos na fronte e na nuca, retração biparietal, orelhas inclinadas, com lóbulos aderidos, hipoplasia malar, órbitas rasas, fendas palpebrais oblíquas para cima, com discreta ptose palpebral, comissuras bucais para baixo, retrognatia, clinodactilia de 5º dedo em mãos, deformidade torácica, tronco aparente curto e discreto encurtamento rizomérico de membros superiores.		
P59	F	RDNPM, frontal abaulado, implantação baixa de cabelos na fronte e na nuca, face triangular, orelhas ligeiramente em abano, sinofriso discreto, fendas palpebrais oblíquas para cima, epicanto bilateral, base nasal alargada com narinas amplas e antevertidas, palato alto, mãos com falanges distais alargadas, hipoplasia de 4º e 5º metacarpianos, hiperextensibilidade articular em mãos e cotovelos, discreta assimetria de membros inferiores, hipoplasia de unha de 5º artelho, mancha café com leite, hipertricose.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – del(12p) MLPA <i>kit</i> P070 – sem alteração Sequenciamento – SNP rs 60220187
P60	M	RDNPM, face atípica, recessão temporal de cabelos, orelhas em abano e em concha, sinofre, fendas palpebrais para baixo,	4	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P61	M	RDNPM, principalmente da fala, agitação psicomotora, dente com implantação anômala em arcada superior e escoliose leve.	1	MLPA <i>kit</i> P036 – del(12p) MLPA <i>kit</i> P070 – sem alteração Sequenciamento – SNP rs 60220187
P62	M	RDNPM, baixo ganho pômbero-estatural, hipertrofia de adenóides, hipoplasia malar, orelhas de implantação baixa, hipertelorismo, fendas palpebrais oblíquas para baixo, ptose palpebral, estrabismo convergente, base nasal alargada, comissuras bucais desviadas para baixo, diástase de retos abdominais, sulco plantar entre hálux e 2º artelho, cúbito valgo discreto, genitália normal com testículos tópicos e de volume adequado, mancha café-com-leite (irregulares) em região lateral direita de abdome.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P63	F	Hipotonia ao nascimento, frontal alto, implantação dos cabelos na fronte alta e na nuca em tridente, face alongada, leve implantação baixa das orelhas, cílios longos, ponte nasal alta, prognatismo, lábios volumosos com eversão do inferior (familiar?), hemitórax esquerdo proeminente, diástase de retos abdominais, sindactilia cutânea leve em mão esquerda 4º e 5º dedos, hiperextensibilidade de dedos das	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

		mãos, cúbito valgo, pêlos pubianos em Tanner P3.		
P64	M	Microcefalia, braquicefalia, occipital plano, implantação alta dos cabelos na fronte, orelhas de implantação baixa com sulco em lóbulo direito, fendas palpebrais oblíquas para cima, pregas epicânticas, estrabismo, microrretrognatia com sulco mentoniano, comissuras bucais desviadas para baixo, filtro curto, palato alto, mamilo supranumerário à direita, diástase de retos abdominais, clinodactilia de quintos quirodáctilos, prega única no dedo mínimo com hipoplasia da falange média bilateral, polegares abduzidos, pregas palmares únicas completa à direita e incompleta à esquerda, acavagamento de quarto sobre quinto artelhos, unhas dos pés hipoplásicas, luxação congênita de quadril e de rádio bilateralmente, foveas em região de clavícula bilateralmente, inversão peno-escrotal parcial, cicatriz cirúrgica em região inguinal e escroto direito, testículos palpáveis em bolsa escrotal bilateralmente, fovea coccígea com manchas “arroxeadas”, hipotonia cérvico-escapular, preensão plantar, atitude com pescoço voltado para direita, choro atípico (“miado de gato”).	8	MLPA <i>kit</i> P036 – del(5p)/dup(9p) MLPA <i>kit</i> P070 – del(5p)/dup(9p) FISH – 46,XY.ish der(5)t(5p;9p)
P65	M	RDNPM, epilepsia, orelhas proeminentes, sinofre, fendas palpebrais alongadas, discreta eversão do 1/3 distal de pálpebra inferior, cílios longos, base nasal alargada, nariz bulboso, lábio superior arqueado, braquidactilia em mãos, alargamento das falanges distais das mãos, hipoplasia de 5º metatarso, distância aumentada entre hálux e 2º artelho, pé plano, hipospadia bálano-prepucial.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P66	M	RDNPM, mais em fala, microcefalia, estrabismo, polidactilia pós-axial, tetralogia de Fallot, distúrbios de deglutição, occipital proeminente, dolicocefalia, microrretrognatia, base nasal alargada, peito escavado, escoliose lombar, orelhas proeminentes, <i>philtrum</i> naso-labial curto.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P67	M	RDNPM, epilepsia, hábito marfanóide, peito escavado leve, dedos das mãos afilados e longos, hipoplasia de 5º dedo dos pés bilateralmente, hiperextensibilidade articular, tecido celular subcutâneo diminuído, comprometimento cognitivo moderado.	1	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P69	M	RDNPM, occipital plano, orelhas em abano, sinofre, base alargada, nistagmo, enoftalmia, <i>philtrum</i> curto, lábios volumosos, dentes serrilhados com aumento da distância, mancha hiperocrômica, neuro-ataxia.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

P70	F	RDNPM, estatura baixa, implantação dos cabelos na nuca em tridente, discreta implantação baixa das orelhas, fendas palpebrais discretamente para cima, base nasal alargada, comissuras bucais desviadas para baixo (mais à direita), filtro longo, lábios volumosos, mamilos invertidos com leve aumento da distância intermamilar, leve hipoplasia de 4º e 5º metacarpianos, pés planos, coxa valga, pequenos lábios hipoplásicos, 4 nevos pigmentados em face e pescoço.	3	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P71	M	Macrocefalia, estatura elevada, occipital plano, face arredondada, orelhas em implantação baixa e abano, fenda palpebral alongada, hipertelorismo, base nasal alargada, <i>philtrum</i> longo e apagado, má oclusão dentária, braquidactilia, excesso de pregas palmares hipoplasia de 4º metacarpiano, clinodactilia de 5º dedo, pés em mata borrão, hérnia inguinal direita, cúbito valgo, hipotonia muscular, hiperextensibilidade articular, tremor ao movimento e incoordenação motora.	6	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração
P72	F	RDNPM grave, baixa acuidade visual central, epilepsia, frontal levemente abaulado, hipoplasia discreta de lóbulo auricular, hipertelorismo, narinas antevertidas, lábio superior arqueado, palato alto, escoliose, pé plano, calcâneo levemente proeminente, hipotonia global, alterações neurológicas.	5	MLPA <i>kit</i> P036 – sem alteração

1. Desnaturação e hibridização das sondas SALSA MLPA

- a. Diluir as amostras de DNA (20 – 500 ng DNA) em TE para a concentração desejada. ()
- b. Acrescentar 2 µL de TE em tubos novos. ()
- c. Colocar 3 µL de DNA (na concentração desejada) em cada tubo. ()
- d. Acertar no termociclador o *Programa MLPA 1* ()
- e. Desnaturar as amostras a 98°C por 5 min; resfriar para 25°C, antes de abrir o termociclador. ()
- f. Preparar a solução de Anelamento ()

Solução de Anelamento

Reagente	Para 1 reação	Para __ reações
Probe Mix (tampa preta)	1,5 µL	
Salsa Buffer (tampa amarela)	1,5 µL	
Total	3,0 µL	

- g. Adicionar 3,0 µL da solução de Anelamento em cada tubo. ()
- h. Misturar com cuidado. Incubar a 95°C por 1 min e em seguida, a 60°C *overnight* (entre 12 e 18hs). ()

2. Reação de ligação

- i. Reduzir a temperatura do termociclador para 54°C. ()
- j. Preparar o Mix ligase-65 ()

Mix ligase-65 (pode ser preparado com até uma hora de antecedência, estocando-o em gelo)

Reagentes	Para 1 amostra	Para _ amostras
Ligase-65 buffer A (tampa transparente)	3,0 µL	
Ligase-65 buffer B (tampa branca)	3,0 µL	
Água deionizada	25,0 µL	
Ligase-65 (tampa verde)	1,0 µL	
Total	32,0 µL	

- k. Adicionar 32,0 µL do Mix ligase-65 em cada tubo, misturando-o bem. ()
- l. Incubar a 54°C por 15 min e, em seguida, aquecer a 98°C por 5 min e 4°C até que seja retirado da máquina. ()

3. Reação de PCR

- m. Preparar tubos 0,2 mL novos e numerá-los. ()
- n. Preparar o Mix SALSA. ()

Mix SALSA

Reagentes	Para 1 amostra	Para __ amostras
SALSA PCR (tampa vermelha)	4,0 µL	
Água deionizada	26,0 µL	
Total	30,0 µL	

- o. Adicionar 30,0 µL do Mix SALSA em cada tubo novo. ()
p. Preparar o Mix Polimerase (sem a Taq DNA Polimerase). ()

Mix Polimerase

Reagentes	Para 1 amostra	Para __ amostras
SALSA primers-PCR (tampa marrom)	2,0 µL	
SALSA enzyme dilution buffer (tampa azul)	2,0 µL	
Água deionizada	5,5 µL	
SALSA Polimerase (tampa laranja)	0,5 µL	
Total	10,0 µL	

- q. Retirar os tubos da máquina, colocando-os no gelo. ()
r. Colocar 10,0 µL da reação em cada tubo novo, com o número correspondente. ()
s. Acertar no termociclador o *Programa MLPA 2* ()
t. Colocar a Taq Polimerase no Mix Polimerase ()
u. Com os tubos ainda já máquina adicionar 10,0 µL do Mix Polimerase em cada tubo e iniciar a reação de PCR. ()

Programa de PCR:
95°C por 30 seg
60°C por 30 seg
72°C por 1 min (35 ciclos)
4°C "for ever"

- v. Retirar os tubos do termociclador
w. Preparar a solução de corrida (para separação dos fragmentos de amplificação por eletroforese).

ABI-PRISM® 310 (Applied Biosystems):
0,75 µL de reação de PCR
0,75 µL de água deionizada
0,5 µL de ROX 500™
13,5 µL de Formamida HI-DI

em tubos próprios de corrida no *ABI-PRISM® 310*

- y. Estocar as reações em refrigerador.
z. Realizar a análise das corridas utilizando os seguintes programas: GeneScan®, Genotyper® e Planilha específica para cada *kit*.