

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA CAROLINA VAQUEIRO FIGUEIREDO

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS CANDIDATAS À ETIOLOGIA
GENÉTICA DE CARDIOPATIA CONGÊNITA ASSOCIADA À DEFICIÊNCIA
INTELECTUAL

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Mestra em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora Doutora Aline Pic-Taylor
Co-Orientadora: Professora Doutora Juliana Forte Mazzeu de Araujo

BRASÍLIA
2016

ANA CAROLINA VAQUEIRO FIGUEIREDO

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS CANDIDATAS À ETIOLOGIA
GENÉTICA DE CARDIOPATIA CONGÊNITA ASSOCIADA À DEFICIÊNCIA
INTELECTUAL.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovada em 05 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Aline Pic-Taylor (Presidente)

UnB

Prof.Dr. Aparecido Divino da Cruz

PUC-GO e LACEN/SES-GO

Dr^a. Déborah Afonso Cornélio

Laboratório Sabin-DF

Prof^a. Dr^a. Daniela Mara de Oliveira

UnB

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Beatriz Vaqueiro Figueiredo, cuja vida daria um filme. Que me ensinou o que significa ser mulher, que sempre foi meu exemplo de força, de persistência e de dedicação. Que sempre que pôde escolheu a família e deu a vida pelos filhos. A quem eu vou sempre dever tudo o que pude me tornar. Minhas vitórias serão sempre também suas. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À minha amada Família Buscapé: meu pai Nilton Figueiredo de Souza e minha mãe Maria Beatriz Vaqueiro Figueiredo pelo sustento material, emocional e espiritual que me tornaram tudo que sou, tenho e serei; à minha irmã Flávia, Márcio, Maria Luísa e Arthur; ao meu irmão Leonardo, Taíssa e Beatriz. Muito obrigada pelo suporte, sem vocês nada valeria a pena. Amo vocês!

Ao meu amor, Fabiana Teixeira, que me apoiou desde que esse mestrado era apenas um plano guardado e me acalmou a cada desespero. Obrigada por me emprestar não só o ombro mas também sua experiência acadêmica e conhecimentos ajudando a me organizar e revisando esse documento. Quero sempre estar do seu lado e partilhar seus sonhos, tornando-os também meus. Te amo! Para completar o meu lar, obrigado aos meus felinos Baleia e Caju pelas barrigas reconfortantes nos dias frios de escrita.

Aos amigos pessoais que ajudaram a manter minha sanidade e bom humor: Carolina Queiroz, Ingrid Martins, Rafaela Toledo, Henrique Valadão, Fernanda Nogales, Ana Carolina Arcanjo, Leonardo Resende, Rafael Castelo, Elisa Colares, Lincoln Coelho, Igor dos Santos e Águeda Macias.

À minha orientadora, Professora Doutora Aline Pic-Taylor, pelo acolhimento e disponibilidade, pela firmeza nas cobranças de prazo e compreensão com sua orientanda enrolada, pelas oportunidades de aprendizado que você generosamente dividiu comigo e por me mostrar que as possibilidades de crescimento são do tamanho do mundo. De modo especial pelo cuidado de corrigir esse documento final junto comigo e me dar a oportunidade de aprender seu modo prático e eficiente de trabalhar em um quase “curso exclusivo de escrita científica”. Que nossa parceria continue! Thank you my dear!

À Professora Doutora Juliana Mazzeu, minha orientadora “não-oficial”, pela oportunidade de fazer parte desse grupo maravilhoso da Genética da UnB. Por todo o aprendizado nesse mundo novo da Citogenética Molecular e da Genética Médica. Obrigada por ser um exemplo de pesquisadora, orientadora e professora e, acima de tudo, por fazer tudo isso com tamanha generosidade.

À equipe do Laboratório de Citogenética no NUGEN-HAB: Minha “braço-direito” Édelyn Nunes, queridas Bianca Fujita, Gabriela Vasconcelos, Luciana Carvalho, Sinara Marques, Beatriz Versiani, Talyta Mattos, Cristina Medina, Lauar Monteiro e Bárbara Zema, e ao bendito fruto Victor Lopes. Obrigada pelo trabalho de vocês na realização das culturas, bandamentos e análises de Cariótipo. Muito obrigada por me aguentarem nos dias com café e nos dias que nem o café salva, por dividirem comigo tanto os chocolates quanto os perrengues e além de tudo, embarcarem nas minhas ideias malucas. Amo mais que Diamante Negro (mentira).

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do NUGEN-HAB: Chefe Claudiner Pereira, Bianca Fujita, Júlia Gouveia e Jéssica dos Santos. Obrigada por me acolherem nessa sala mágica que mesmo tão pequena acolhe tantas lições, tantas ideias e tantos projetos.

Especialmente ao orientador “não-oficial”, Dr. Claudiner Pereira, o primeiro de seu nome, o senhor das lições moleculares, nascido das tormentas biológicas, forjado nas chamas da virologia, libertador das dúvidas genômicas, senhor das bancadas e das pipetas, doutrinador dos desleixados, imolador dos preguiçosos, invocador das canecas, dos rocks e das caveiras, vigilante da fronteira dos protocolos, padroeiros das rotinas cabalísticas, cavaleiro das pós-graduandas desesperadas, companheiro das mendicâncias dos laboratórios desprovidos e pacificador dos reinos das ideias mirabolantes. Muito obrigada Chefe!

À toda equipe da Genética do Hospital Universitário de Brasília, Doutora Íris Ferrari, nossa inspiração; às médicas Mara Córdoba, Beatriz Versiane e Rosenelle Araújo e à equipe técnica do Laboratório, e ao colega de mestrado Pedro Rodrigues.

À equipe do Laboratório de Genética do Instituto de Biologia, à Professora Doutora Silviene Fabiana de Oliveira, também minha orientadora “não-oficial”, pelas lições desde a graduação e pelo acolhimento em seu laboratório. A todos os colegas de bancada em especial ao doutorando Raphael Bonadio.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira e à equipe Laboratório de Sequenciamento da Universidade Católica de Brasília, especialmente aos técnicos Adevilton, Davi e Lucas, pela disponibilidade e genotipagem das amostras de MLPA.

Ao Núcleo de Genética da SES-DF: Dra. Maria Terezinha Cardoso, Coordenadora de Doenças Raras; Dra. Giselle Maria Araújo Félix Adjuto, Chefe do NUGEN-HAB; à equipe médica do NUGEN-HAB e à direção do Hospital de Apoio de Brasília pelo apoio à realização desse projeto.

Aos diversos servidores desconhecidos dos prontos-socorros, enfermarias e UTIs da SESDF e do HUBDF, cujos relatórios e evoluções em prontuários ilustram tantas necessidades nos serviços de saúde e ao mesmo tempo me revelam profissionalismo, muito compromisso e uma luta incansável pela vida e pelo bem-estar de cada paciente.

Às pacientes e aos pacientes participantes desse estudo, às mães, pais, avós e outros familiares que vivenciam as agruras pelas quais passa um portador de cardiopatia e/ou doenças raras em tratamento. A vocês minha gratidão pela participação, o desejo de saúde e especialmente a renovação do meu compromisso pessoal, enquanto servidora do SUS, por um atendimento mais humanizado.

À banca examinadora, pela disposição e pelas contribuições para esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, em especial à Coordenadora Eliete Neves e à servidora Edigrês.

À FAP-DF pelo financiamento desse trabalho e incentivo à pesquisa no DF.

Ao universo que me proporcionou ao longo desse mestrado tantos conhecimentos, tantos encontros, autoconhecimento e tantos puxões de orelha.

" Sou daquelas pessoas que pensam que a Ciência guarda uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, é também uma criança, posto ante fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas."

Marie Sklodowska, mais conhecida como Marie Curie

RESUMO

As anomalias cromossômicas são a causa mais frequentemente descrita na literatura para explicar a etiologia das malformações congênitas, especialmente em casos que envolvem cardiopatia congênita (CC) e deficiência intelectual (DI). Esse estudo tem o objetivo de identificar a contribuição de diferentes técnicas de citogenética clássica e molecular para o diagnóstico genético de pacientes com CC e DI e outras possíveis malformações congênitas. Avaliamos a aplicação de um fluxograma de diagnóstico utilizando as técnicas de cariótipo, MLPA (do inglês, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) e CMA (do inglês Chromosomal Microarrays). Foram selecionados 20 pacientes portadores de diferentes cardiopatias e deficiências intelectuais e suas amostras foram submetidas ao fluxograma diagnóstico proposto. A partir da aplicação do fluxograma foi possível identificar alterações patogênicas ou possivelmente patogênicas em 75% dos casos, confirmando a eficiência dos exames propostos para diagnóstico de CCs e DIs. A identificação de 45% dos pacientes como portadores da Síndrome de deleção 22q11.2 ressalta a importância da triagem dessa alteração submicroscópica em portadores de CCs e DIs. Foram identificados ainda genes-candidatos a explicar a associação entre CC e DI. O estudo apresentado ressalta a importância da diversificação das técnicas de diagnóstico genético para maximização da capacidade diagnóstica, especialmente a partir da inclusão de técnicas de citogenética molecular.

Palavras-chave: cardiopatia congênita; deficiência intelectual; MLPA; CMA; CNVs.

ABSTRACT

Chromosomal abnormalities are frequently related to the etiology of congenital malformations, especially in cases involving congenital heart defects (CHD) and intellectual disability (ID). This study aims to identify the contribution of different cytogenetic techniques in the diagnosis of patients with intellectual disabilities and congenital heart defects (CHD). We propose the application of a flow chart composed of classical and molecular techniques (karyotype, MLPA and microarray) to identify the contribution of each specific technique in routine diagnosis. Samples from 20 patients with different heart defects and intellectual disabilities were processed according to the flowchart. Pathogenic or potentially pathogenic changes were identified in 75% of the cases, thereby confirming the efficiency of the proposed tests for the diagnosis of CHDs and IDs. The identification of 45% of the patients with the 22q11.2 deletion syndrome emphasizes the importance of screening this alteration in patients with CHDs. We also suggest candidate genes to explain the association between CHDs and IDs. The present study emphasizes the importance of diverse genetic diagnostic techniques to maximise diagnostic capacity, particularly the inclusion of molecular cytogenetic techniques.

Keywords: congenital heart disease; intellectual disabilities; MLPA ; CMA ; CNVs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da morfogênese cardíaca.	21
Figura 2. Posição e contribuição do Campo Cardíaco Secundário.	22
Figura 3. Resumo do conceito “ <i>uma cardiopatia- diversos mecanismos- diversos genes</i> ”.	24
Figura 4. Sequencia de realização do MLPA.	38
Figura 5. Eletroferograma ilustrativo do kit P250.	39
Figura 6. Fluxograma de diagnóstico do estudo.	47
Figura 7. Taxa de diagnóstico de alterações patogênicas após a aplicação do fluxograma proposto.	58
Figura 8. Visualização da deleção típica de 3Mb na região 22q11.2 utilizando a técnica de MLPA utilizando o kit P250 (MRC-Holland).	67
Figura 9. Deleção da região típica de 3Mb na região 22q11.2 encontrada em 8 pacientes.	68
Figura 10. Deleção em 22q11.2 de 1,5Mb identificada na paciente P19..	73
Figura 11. . Representação da região 22q11.2 e as microdeleções mais recorrentes.	75
Figura 12. . Modelos de rearranjos cromossômicos na região 22q11.	77
Figura 13. Deleção de 1,3 Mb na região 3q26.32 da paciente P3.	81
Figura 14. Duplicação de 3,6 Mb identificada no paciente P4.	83
Figura 15. Duplicação na região 6p25.3p25.1 com 5,45 Mb, identificada no paciente P5.	84
Figura 16. Deleção na região 20q13.33 de 1,3 Mb, contendo 59 genes identificada no paciente P5.	86
Figura 17. Deleção identificada no paciente P20 na região 3q22.3 de 90Kb, envolvendo o gene <i>PIK3CB</i> .	88
Figura 18. CNV classificada como VOUS identificada no paciente P15.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CNVs descritos em casos de cardiopatias congênitas não sindrômicas.	27
Tabela 2. Ocorrências sindrômicas de DI/ADNPM e cardiopatias congênitas.	30
Tabela 3. Critérios gerais de investigação da patogenicidade dos CNVs.	41
Tabela 4. Resumo das alterações identificadas em todos os pacientes analisados.	55
Tabela 5. Resumo do grupo amostral avaliado e seus sinais e sintomas.	61
Tabela 6. Resumo clínico dos pacientes portadores de deleção na região 22q11.2 estudados.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Cardiopatía congênita
DI	Deficiência intelectual
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence in situ hybridization</i> .
MLPA	Do inglês, <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
CMA	Do inglês <i>Chromosomal Microarrays</i>
ADNPM	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
CNV	Do inglês, Copy Number Variation
AS	Estenose da Aorta
ASD	Defeito de septação atrial
AVSD	Defeito de septação atrioventricular
CoA	Coactação de aorta
HLH	Hipoplasia do coração esquerdo
PA	Atresia de artéria pulmonar
TOF	Tetralogia de Fallot
VSD	Defeito de septação ventricular
DILV	Dilatação ventricular
DORV	Dupla via de saída do ventrículo direito
BAV	Valva aórtica bicúspide
TAPVR	Retorno venoso pulmonar anômalo total
PVM	Prolapso de valva mitral
AV/MVD	Defeitos no canal atrioventricular e valva mitral
LVOT	Obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo
CMP	Cardiomiopatias
LCR	Do inglês, <i>Long Copy Repeat</i>
CES	Cromossomo supranumerário bisatélite da síndrome <i>Cat Eye</i>
SES/DF	Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal
NUGEN-HAB	Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília-SES/DF
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEP-FM	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da

	Universidade de Brasília
EDTA	Ácido etileno diamina tetracético
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute frequentemente utilizado em Citogenética
SNP	Do inglês, Single Nucleotide Polymorphism
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
DECIPHER	Do inglês, <i>Data base of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
DGV	Do inglês, <i>Database of Genomic Variation</i>
OMIM	Do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Man database</i>
VOUS	Do inglês, Variants Of Unknown Significance
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
FOP	Forame oval patente
GTG	Também referido como Banda G, é um padrão de bandas utilizado em citogenética que age nas bandas G cromossômicas, a partir da utilização de Tripsina e corante Giemsa.
PCA	Persistência do canal arterioso
DSAV	Defeito do septo atrioventricular
ASD	Do inglês, <i>Autism spectrum disorder</i>
AGVP	Agenesia de valva pulmonar
AGVAV	Agenesia de valva atrioventricular
TI	Insuficiência de tricúspide
HAA	Hipoplasia de arco aórtico
PLSVC	Persistência de veia cava superior a esquerda
RSAA	Arco aórtico a esquerda
PS	Estenose de artéria pulmonar
DC	Dextrocardia
TOF	Tetralogia de Fallot
TOF&PA	Tetralogia de Fallot com atresia de artéria pulmonar
IAA	Interrupção do Arco Aórtico
TGA	Transposição de Grandes Artérias

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	18
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA ABORDADO	18
1.2 CARDIOPATIAS CONGÊNITAS	19
1.2.1 Embriologia do Coração	20
1.2.2 Novos direcionamentos no estudo das cardiopatias congênitas	23
1.2.3 Etiologia das cardiopatias congênitas	24
1.2.4 Causas não genéticas: Fatores ambientais relacionados às cardiopatias congênitas	25
1.2.5 Causas genéticas: Ocorrências não-sindrômicas de cardiopatias	25
1.2.6 Causas genéticas: Ocorrências sindrômicas de cardiopatias	29
1.3 A DEFICIÊNCIA INTELECTUAL	32
1.3.1 Etiologia genética das DIs	33
1.3.2 Alterações cromossômicas como causas de DI	34
1.4 TÉCNICAS DE DIGNÓSTICO GENÉTICO	36
1.4.1 Exame de cariótipo	36
1.4.2 Exame de MLPA	37
1.4.3 Análise cromossômica por microarray (CMA)	40
1.4.4 Interpretação das variações no número de cópias	40
2. OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. MÉTODOS	45
3.1 ENCAMINHAMENTO DOS PACIENTES	45
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	45
3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	45
3.4 GRUPO AMOSTRAL	46
3.5 MATERIAL BIOLÓGICO	46

3.5 EXAME DE CARIÓTIPO	49
3.5.1 Cultura celular	49
3.5.2 Análise dos Cariótipos	49
3.6 EXAMES MOLECULARES	50
3.6.1 Extração de DNA	50
3.6.2 Exame de MLPA	51
3.6.3 Análise cromossômica por microarray	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 SINAIS E SINTOMAS DOS PACIENTES.....	60
4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA	65
4.3 RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO POR MLPA- PORTADORES DA SÍNDROME DA DELEÇÃO 22Q11.2	67
4.3.1 A Síndrome da deleção 22q11.2	73
4.4 PACIENTES INVESTIGADOS POR ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA)	79
4.3.1 Pacientes com alterações benignas	79
4.3.2 Pacientes com alterações patogênicas	81
4.3.3 Pacientes com alterações potencialmente patogênicas	87
4.3.4 Pacientes com alterações VOUS	89
4.5 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS RARAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.....	91
5 CONCLUSÕES	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8 ANEXOS	101
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UnB	101
APÊNDICE A - Termo de Consentimento.....	102
APÊNDICE B- Artigo científico submetido.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 . CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA ABORDADO- INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DAS CARDIOPATIAS CONGÊNITAS ASSOCIADAS A DEFICIÊNCIA INTELECTUAL.

As anomalias cromossômicas são a causa mais frequentemente descrita na literatura, para explicar a etiologia das malformações congênitas, ocorrendo em até 28% dos casos de deficiência intelectual (DI) [1]. Adicionalmente, estima-se que 30% das crianças com alterações cromossômicas apresentam cardiopatias congênitas (CC) [2].

As técnicas de citogenética clássica permitem a identificação de alterações maiores que 5 -10 Mb. Com o advento de novas técnicas de citogenética molecular tornou-se possível caracterizar uma diversidade de alterações submicroscópicas muito menores do que aquelas previamente identificadas. A alteração pode modificar o número de cópias de um gene, de alguns genes ou até mesmo de grandes segmentos de um cromossomo (duplicação, deleção, inversão, translocação, entre outros).

Alterações submicroscópicas com tamanhos entre 0,5 Mbp e 10 Mbp são frequentemente observadas em indivíduos com DI e outra anomalia congênita. Essa correlação é ainda mais expressiva em indivíduos que apresentam DI em associação a anomalias cardiovasculares, craniofaciais ou autismo [3].

Essas constatações motivaram a realização desse estudo que visava identificar a etiologia genética de cardiopatias congênita associada a deficiências intelectuais. Para isso foi utilizado um fluxograma de técnicas clássicas e moleculares (cariótipo, MLPA, CMA) buscando identificar não só a eficiência de cada técnica, mas também a contribuição específica de cada técnica no diagnóstico de rotina de pacientes com cardiopatia associada à DI.

Assim é importante, no contexto desta dissertação, expor o entendimento mais atual tanto sobre a DI, quanto as cardiopatias congênitas.

1.2 CARDIOPATIAS CONGÊNITAS

O termo Cardiopatia Congênita (CC) é utilizado nesse estudo conforme descrito por Stevenson e colaboradores (1991), para fornecer um panorama dos diferentes defeitos estruturais do coração. O termo compreende os defeitos intra-cardíacos, tais como os ocorridos nas câmaras atriais, ventriculares e em suas septações, defeitos nas valvas semilunar e atrioventricular, e ainda alguns defeitos extra-cardíacos que sejam embriologicamente relacionados com as estruturas cardíacas. Portanto, além dos já citados, estão abarcados no termo Cardiopatias Congênitas os defeitos conotruncais, e os defeitos nas veias e artérias sistêmicas e pulmonares [4].

Na tentativa de focar melhor o campo de estudo nas malformações das estruturas cardíacas, foram excluídas desse estudo as cardiomiopatias, os distúrbios de ritmo e a hipertensão pulmonar primária.

Defeitos cardíacos são a causa mais comum de morte por defeito congênito, com prevalência estimada de 8 a cada 1000 nascimentos [5]. A introdução de políticas públicas de saúde relacionadas ao cuidado pré-natal e neonatal, a realização de imediata avaliação das condições respiratórias, cardiocirculatórias e de malformações aparentes no neonato ainda na sala de parto facilitam a detecção de indícios de cardiopatia e permitem que as anomalias cardiovasculares sejam identificadas, acompanhadas e tratadas de forma precoce e intensiva. Tais medidas permitem o acompanhamento da morbidade relacionada a malformações do sistema circulatório, e aliadas ao avanço das tecnologias de diagnóstico por imagem e das alternativas de tratamento têm melhorado o prognóstico, e levado à redução da mortalidade a elas relacionada. Estima-se que 75% das crianças portadoras de cardiopatias poderão viver até a idade adulta e levar uma vida produtiva [6].

Entretanto, nossa compreensão das bases genéticas das CCs permanece limitada, dado que a diversidade de defeitos cardíacos existentes não são manifestações variáveis de uma única anormalidade durante o desenvolvimento, e sim uma coleção etiologicamente heterogênea de

malformações, que sobrepõe fatores genéticos e ambientais [5]. Os avanços das tecnologias de diagnóstico e das políticas de atenção à saúde contribuíram para a conscientização da necessidade de identificar, além dos fatores ambientais, os genes e mecanismos genéticos envolvidos em todas as formas de doença cardíaca congênita, seja ela isolada ou sindrômica. O diagnóstico genético preciso para um paciente com um defeito cardíaco congênito gera vários benefícios, incluindo a capacidade de fornecer aconselhamento sobre prognóstico, a causalidade e o risco de recorrência para os pacientes e seus familiares [5]. Para adequada compreensão das cardiopatias congênitas e o estudo de sua etiologia, o primeiro passo é a compreensão das estruturas e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do coração.

1.2.1 Embriologia do Coração

Compreender o desenvolvimento cardíaco é essencial para a compreensão das diversas cardiopatias congênitas existentes, observando especialmente os mecanismos que levam a formação dos campos cardíacos embrionários, as estruturas que posteriormente serão formadas a partir desses campos, os mecanismos de remodelagem do órgão, de septação das câmaras cardíacas e as alterações na circulação fetal ao nascimento [7].

As etapas primordiais para a formação do coração estão apresentadas na Figura 1 e compreendem:

A) a formação do crescente cardíaco primário em formato de ferradura, com a promoção da especificação precoce das células progenitoras em mesoderma cardiogênico (Figura 1-A);

B) a formação dos cordões angioblásticos no crescente cardíaco primário, levando à formação de dois tubos endocárdicos nas laterais do embrião. A partir do dobramento do embrião os dois tubos endocárdicos se unem em um tubo único, denominado tubo cardíaco primitivo (Figura 1-B);

C) a elongação e dobramento do tubo cardíaco primitivo que promove uma divisão prévia desse tubo em câmaras cardíacas primitivas, reorganizadas a partir da expansão das câmaras cardíacas primordiais até alcançarem a posição espacial definitiva (Figura 1-B);

D) a septação das câmaras cardíacas e gênese das valvas que finalizam a formação de um coração com quatro câmaras delimitadas e que permite o fluxo sanguíneo paralelo, compondo a circulação sistêmica e a pulmonar (Figura 1-D) [8–10].

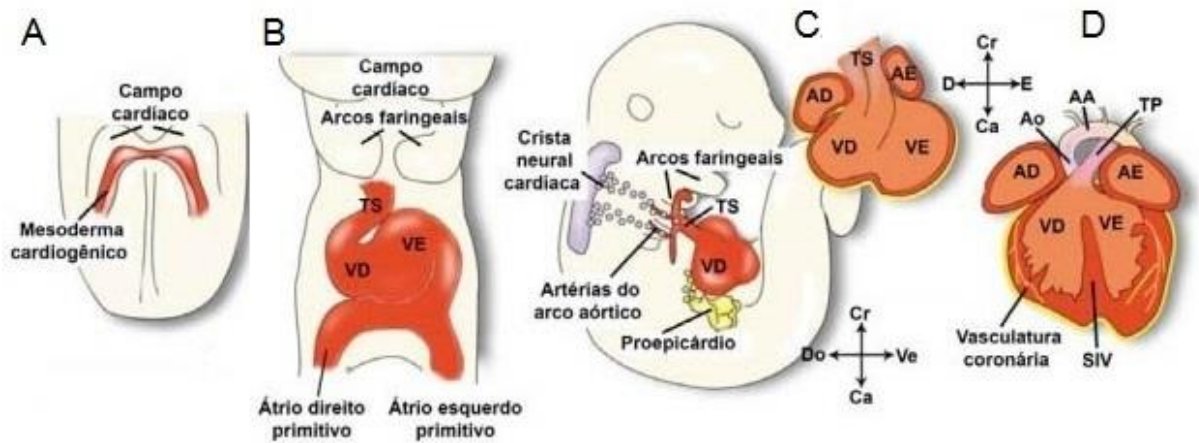


Figura 1. Etapas da morfogênese cardíaca, ilustrando a formação do tubo cardíaco primário a partir do campo cardíaco primário, o dobramento do tubo cardíaco que resulta na formação das câmaras cardíacas primitivas (A e B), a contribuição de outras populações celulares para a formação de estruturas específicas (C) e as câmaras cardíacas formadas a partir da septação. TS: trato de saída, VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito, AE: átrio esquerdo, AD: átrio direito, AO: artéria aorta, AA: arco aórtico, TP: tronco pulmonar, SIV: septo interventricular. Marcadores de posição do embrião- Cr: cranial, Ca: caudal, D: direito, E: esquerdo, Do: dorsal, Ve: ventral. Adaptado de [11].

Estudos recentes trouxeram uma nova compreensão do mecanismo de formação do coração, elucidando a participação de populações de células específicas na formação cardíaca. É importante compreender a contribuição das células da crista neural, do pró-epicárdio e das células provenientes do

campo cardíaco secundário (Figura 1-C) na gênese cardíaca e a relação entre o genótipo dessas e as cardiopatias [7].

Compreende-se atualmente que o chamado Campo Cardíaco Primário não é a única origem das células cardiogênicas e que outras células precursoras também são recrutadas da porção do mesoderme adjacente ao crescente cardíaco, o chamado Campo Cardíaco Secundário. São recrutadas células tanto da porção cranial quanto da caudal do Campo Cardíaco Secundário (Figura 2), todas participam concomitantemente da alongação do tubo cardíaco [9].

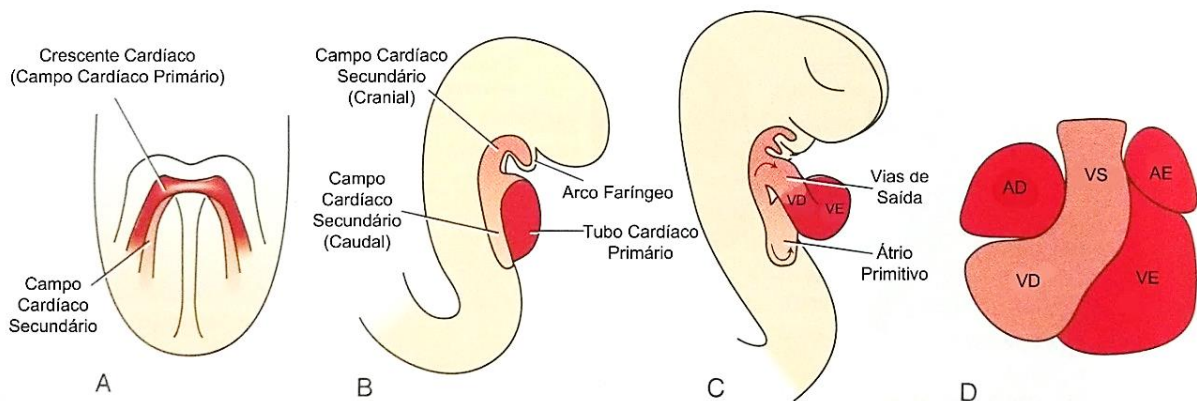


Figura 2. Posição e contribuição do Campo Cardíaco Secundário. (A) Localização do Campo Cardíaco Secundário (em rosa claro), que posteriormente se divide (B) em uma porção cranial, que participa da alongação do tubo cardíaco primário em sua porção arterial, e outra caudal, que participa da formação do seio venoso (C). (D) vista ventral mostrando a participação dos Campos Cardíacos Primário (em vermelho) e Secundário (em rosa claro) no coração em formação. AD: Átrio Direito; AE: Átrio Esquerdo; VD: Ventrículo direito; VE: Ventrículo Esquerdo; VS: Vias de Saída do coração. Adaptado de [8].

Boa parte das células do campo cardíaco secundário migra inicialmente para a região de desenvolvimento dos arcos faríngeos e adentra o coração em desenvolvimento após o dobramento do tubo cardíaco primordial, permanecendo nas vias de entrada e saída do coração, onde se diferenciam em células musculares, ou chegando às câmaras internas onde passam a fazer parte do endotélio ou miocárdio. A elucidação dos

mecanismos de diferenciação das células do campo cardíaco secundário ampliou a compreensão de defeitos cardíacos específicos: os defeitos conotruncais frequentemente associados a malformações dos arcos faríngeos , malformações cardíacas específicas do lado direito como ventrículo direito hipoplásico, anomalia de Ebstein, e algumas formas de displasia arritmogênica do ventrículo direito [12].

As células da crista neural participam da formação do sistema nervoso periférico e do aparelho faríngeo. No coração, essas células estão envolvidas na septação das vias de saída do órgão, formando uma massa central de mesênquima que leva à fusão dos coxins endocárdicos [8].

Desse modo, as células da crista neural podem explicar a associação entre os defeitos craniofaciais e as cardiopatias congênitas, presentes concomitantemente em diversas síndromes [6].

1.2.2 Novos direcionamentos no estudo das cardiopatias congênitas

A busca da correlação entre fenótipo e genótipo deve levar em conta a heterogeneidade das cardiopatias congênitas. Uma única alteração genética tem potencial para impactar um conjunto diverso de moléculas e vias que orquestram o desenvolvimento cardiovascular [7]. Conseqüentemente, uma mesma alteração é capaz de dar origem a diversos fenótipos, uma vez que um grupo de fenótipos anatomicamente heterogêneo pode ter uma mesma origem embriológica [7].

Inversamente, um mesmo fenótipo de cardiopatia pode ter origem em diversos mecanismos embriológicos, sob a influência de diversos genes [6]. Isso justifica a ocorrência de uma mesma cardiopatia decorrente de alterações distintas, em genes diferentes e envolvendo outros mecanismos embriológicos (Figura 3) [7].

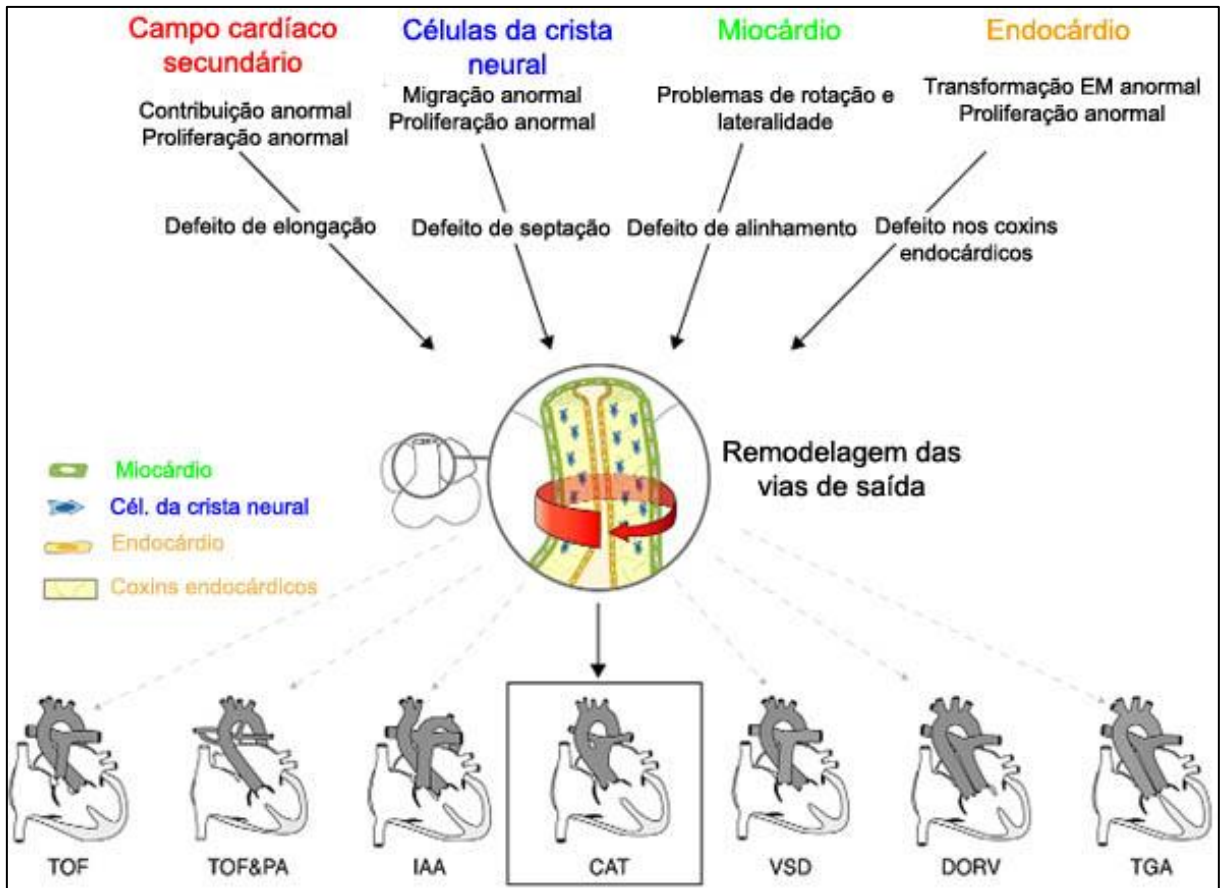


Figura 3. Resumo do conceito “*uma cardiopatia- diversos mecanismos- diversos genes*”, segundo o qual a cardiopatia Tronco Arterial Comum (CAT) pode ser resultado de defeitos de proliferação das células do Campo Cardíaco Secundário e/ou das células da crista neural e/ou das células do miocárdio e/ou das células do endocárdio. Do mesmo modo, alteração de um mesmo mecanismo (alongação, septação, alinhamento) pode dar origem a um amplo espectro de cardiopatias como Tetralogia de Fallot (TOF) Tetralogia de Fallot e Atresia Pulmonar(TOF&PA), Interrupção do Arco Aórtico (IAA), Defeito de Septação Ventricular (VSD), Dupla Via de Saída do Ventrículo Direito (DORV) ou Transposição de Grandes Artérias (TGA). *Adaptado de[5].

1.2.3 Etiologia das cardiopatias congênitas

A investigação etiológica das cardiopatias congênitas deve levar em conta diversos aspectos. O estudo de cada caso deve ser capaz de analisar o histórico familiar do paciente, buscando outras ocorrências familiares de alterações relacionadas. Deve conter um estudo clínico observador, focando não somente nas alterações cardiológicas, mas também em outras malformações que direcionem para uma caracterização de cardiopatia

sindrômica ou isolada. E deve observar a história clínica do paciente, atentando para agentes infecciosos e substâncias teratogênicas que podem ter causado o quadro [6].

1.2.4 Causas não genéticas: Fatores ambientais relacionados às cardiopatias congênitas

Diversas causas não-genéticas têm sido identificadas ao longo dos anos como causadoras de alterações cardiogênicas. A infecção materna por rubéola é possivelmente um dos primeiros fatores ambientais relacionados às cardiopatias congênitas. A exposição materna a medicamentos como a talidomida (sedativo), trimetadiona (anticonvulsivante), e até mesmo a exposição ambiental a diferentes agentes teratogênicos como a dioxina, bifenilas policloradas e diversos pesticidas têm sido relacionadas ao risco aumentado de desenvolvimento de defeito cardíaco no feto [5] .

Apesar de um número cada vez maior de substâncias relacionadas a cardiopatias, as causas ambientais de maior importância são a ocorrência de diabetes materna e o uso de drogas, especialmente álcool. A importância desses fatores externos se dá por sua alta incidência clínica, pela elevada possibilidade de identificação desses fatores no pré-natal, e pela importância de excluir ou minimizar esses fatores em uma próxima gravidez [6] .Portanto, é essencial a investigação da exposição a fatores ambientais em genética clínica para, em paralelo com o diagnóstico genético, fornecer cálculos de recorrência e aconselhamentos genéticos mais precisos.

1.2.5 Causas genéticas: Ocorrências não-sindrômicas de cardiopatias

As alterações no número de cópias (CNVs) estão associadas a ocorrência de CC em 5 a 10% dos casos. A identificação dessas alterações é essencial para ampliar o entendimento da relação genótipo-fenótipo, corroborando a importância de genes já descritos em casos sindrômicos e

oportunizando a identificação de novos genes causais [2,6]. A Tabela 1 detalha as CNVs descritas para casos não sindrômicos que envolvem cardiopatias congênitas.

LOCUS	TAMANHO (KB)	TIPO DE CNV	GENES CANDIDATOS	FENÓTIPO	NÚMERO DE CASOS DESCRITOS
1q21.1	418–3,981	Deleções, Duplicações	PRKAB2, FM05, CHD1L, BCL9, ACP6, GJA5, CD160, PDZK1, NBPF11, FMO5, GJA8	TOF, AS, Coa, PA, VSD	21
3p25.1	175–12,380	Duplicações	RAF J, TMEM40	TOF	3
3q22.1– 3q26.1	680–32134	Deleções, Duplicações	FOXL2, NPHP3, FAM62C, CEP70, FAIM, PIK3CB, FOXL2, BPESC1	DORV, TAPVR, AVSD	3
4q22.1	45	Duplicações	PPM1K	TOF	2
5q14.1- q14.3	4,937–5454	Duplicações	EDIL3, VCAN, SSBP2, TMEM167A	TOF	2
5q35.3	264–1777	Duplicações	CNOT6, GFPT2, FLT4, ZNF879, ZNF345C, ADAMTS2, NSD1	TOF	4
7q11.23	330–348	Duplicações	FKBP6	HLH, Ebstein's	2
8p23.1	67–12,000	Deleções, Duplicações	GATA4, NEIL2, FDFT1, CSTB, SOX7	AVSD, VSD, TOF, ASD, BAV	10
9q34.3	190–263	Deleções	NOTCH1, EHMT1	TOF, CoA, HLH	3
11p15.5	256–271	Duplicações	HRAS	DILV, AS	2

13q14.11	555–1430	Duplicações	TNFSF11	TOF, TAPVR, VSD, BAV	3
15q11.2	238–2,285	Deleções	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	CoA, ASD, VSD, TAPVD	12
16p13.11	1414–2903	Duplicações	MYH11	HLH	3
18q11.1– 18q11.2	308–6118	Duplicações	GATA6	VSD	2
19p13.3	52–805	Deleções, duplicações	MIER2, CNN2, FSTL3, PTBP1, WDR18, GNA11, S1PR4	TOF	3
Xp22.2	509–615	Duplicações	MID1	TOF, AVSD	2

Tabela 1. CNVs e genes candidatos descritos em casos de cardiopatias congênitas não sindrômicas. AS: estenose da Aorta, ASD: Defeito de septação atrial, AVSD: defeito de septação atrioventricular, CoA: coactação de aorta, HLH: hipoplasia do coração esquerdo, PA: atresia de artéria pulmonar, TOF: tetralogia de Fallot, VSD: defeito de septação ventricular, DILV: dilatação ventricular, DORV: dupla via de saída do ventrículo direito, BAV: valva aórtica bicúspide, TAPVR: retorno venoso pulmonar anômalo total. (Modificado de [2,6].

1.2.6 Causas genéticas: Ocorrências sindrômicas de cardiopatias

Frente a variedade de genes que coordenam a formação do coração e os diversos mecanismos que concomitantemente orientam o desenvolvimento global do embrião, é razoável imaginar que alterações que interferem nessa complexa organização podem ocasionar múltiplas malformações. Do ponto de vista da genética clínica, é essencial avaliar se a CC é uma ocorrência isolada ou se está associada a outras características de modo a compor uma síndrome (Rimoin et al., 2005).

Algumas síndromes apresentam características específicas, atípicas e facilmente reconhecíveis, outras podem ser de caracterização mais complexa, podendo por exemplo apresentar manifestações fenotípicas variáveis. A partir da análise do histórico familiar, da história clínica e de uma avaliação clínica acurada do paciente é possível caracterizar a cardiopatia como parte de um quadro sindrômico observando a ocorrência de outras características. É importante considerar ainda a expressão das características sindrômicas em relação à idade dos pacientes: os mais jovens podem não ter manifestado completamente as características descritas para a síndrome; para pacientes mais velhos, deve-se sempre considerar o diagnóstico diferencial com outras síndromes antes de caracterizar a cardiopatia estudada como isolada (Rimoin et al., 2005). É interessante notar nas principais síndromes que envolvem as CC a ocorrência concomitante de fenótipos de DI ou de ADNPM (Tabela 2).

Síndrome	Alteração genética	DI	Frequência de CC	CC mais comuns	Sinais e sintomas
Deleção 1p36	Deleção em 1p36	Moderada	43-70%	PDA, CMP	Fácies típica, perda auditiva, anomalias orofaciais, microcefalia
Cri-du-chat	Deleção em 5p15.2	Grave	10-55%	VSD, PDA, ASD, TOF	Microcefalia, facies típica, hipertelorismo, epicanto, hipotonia, implantação baixa de orelhas, malformações de laringe
Williams-Beuren	Deleção 7q11.23	ADNPM	80-100%	SVAS, PS, AS, AV/MVD	Hipercalcemia infantil, face "élfica", personalidade sociável, anomalias renais
Jacobsen	Deleção em 11q23	ADNPM	>50%	HLH, LVOT	Craniossinostose, facies típica, estrabismo, campodactilia bilateral, trombocitopenia autoimune
Patau	Trissomia do 13	Grave	80-100%	ASD, VSD, PDA, HLH	Microcefalia, microftalmia, holoprosencefalia, defeitos no couro cabeludo, fenda labial e/ou palatina, polidactilia, onfalocele, anomalias geniturinárias.
Edwards	Trissomia do 18	Grave	90-100%	ASD, VSD, PDA, TOF, DORV, CoA, BAV	Polihidrâmnios, hipertonia, hérnia diafragmática, onfalocele, pé torto congênito.
Down	Trissomia do 21	Moderada	40-50%	ASD, VSD, AVSD, TOF	Hipotonia, epicanto, macroglossia, perda auditiva condutiva, prega palmar única.
Deleção 22q11.2	Deleção em 22q11.2	Variável, especialmente dificuldades de aprendizagem e fala	75%	IAA tipo B, AAA, Tronco arterioso, TOF, TA, VSD	Baixa implantação de orelhas, hipoplasia de timo e paratireoide, imunodeficiência, hipocalcemia, anomalias renais.
Olho de	Inversão/duplicação	Leve, Limítrofe	>50%	TAPVR, TOF	Coloboma de íris, apêndices auriculares, anomalias

gato	em 22q11				renais, atresia anal.
Turner	Monossomia do X	Dificuldades de aprendizagem	20-50%	CoA, BAV, AS, HLH, PAPVD sem ASD	Baixa estatura, pescoço alado, linfedema, aumento da distância intermamilar com mamilos hipoplásicos, baixa implantação de cabelos na nuca, disgenesia gonadal, amenorréia primária.
Klinefelter	47,XXY	Variável	50%	PDA, ASD, PVM (prolapso de valva mitral)	Alta estatura, testículos hipoplásicos, puberdade tardia.

Tabela 2. Ocorrências sindrômicas de DI/ADNPM e cardiopatias congênitas.* AAA: anomalias do arco aórtico, AS: estenose da Aorta, ASD: Defeito de septação atrial, AVSD: defeito de septação atrioventricular, CoA: coactação de aorta, HLH: hipoplasia do coração esquerdo, PDA: ducto arterioso patente, PS: estenose pulmonar, PTA: persistência do canal arterial, TA: atresia de valva tricúspide, TOF: tetralogia de Fallot, VSD: defeito de septação ventricular, DORV: dupla via de saída do ventrículo direito, BAV: valva aórtica bicúspide, IAA: interrupção do arco aórtico, PAPVD sem ASD: drenagem venosa pulmonar anômala parcial sem defeito de septação atrial, TAPVR: retorno venoso pulmonar anômalo total, PVM: prolapso de valva mitral, AV/MVD: defeitos no canal atrioventricular e valva mitral, LVOT: obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo, CMP: cardiomiopatias. Adaptado de [13]

1.3 A DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A deficiência intelectual (DI) é causa frequente nos encaminhamentos dos serviços de genética médica e é também o tipo mais comum de deficiência de desenvolvimento, afetando de 1-3% da população mundial. A DI tem sido descrita historicamente através do uso de diversos termos como retardo mental, deficiência mental, dificuldade de aprendizagem, retardo de desenvolvimento, entre outros [14]. A terminologia atual, deficiência intelectual, permite inicialmente a descrição do sintoma como um impedimento, uma limitação; eliminando a lógica nociva de anormalidade ou incapacidade. Além disso, o termo intelectual enfatiza o entendimento dessa como pertencente ao intelecto em si, fazendo uma importante distinção com as doenças mentais, eliminando uma confusão que perdurou por séculos [13].

A Deficiência Intelectual (DI) pode ser definida como um prejuízo da capacidade cognitiva e de comportamentos adaptativos manifestados antes dos 18 anos de idade [15].

As funcionalidades intelectuais ou comportamentos adaptativos abrangem as seguintes capacidades mentais: comunicação, cuidados pessoais, rotinas domésticas, acesso Comunitário, auto-governança, saúde e segurança pessoal, habilidades acadêmicas funcionais, atividades de lazer e trabalho [16].

A capacidade intelectual é usualmente avaliada a partir de testes de quociente intelectual, conhecidos como teste de QI, em que valores a baixo de 75 indicam comprometimento intelectual. É usual ainda a aplicação de testes que avaliam o desempenho em cada um dos comportamentos adaptativos, sendo o déficit em dois ou mais comportamentos adaptativos interpretado como DI [17].

Os primeiros sinais de DI podem ser identificados precocemente na infância, através da observação dos atrasos no alcance de marcos do desenvolvimento neuropsicomotor até os 2 anos de idade, como exibição de reflexos motores e orais, desenvolvimento paulatino de diversos movimentos

como erguer a cabeça, sentar-se, levanta-se, caminhar, falar, entre outros [18].

Em casos de suspeita de DI em menores de 5 anos, utiliza-se o termo atraso global do desenvolvimento ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM). A observação dos marcos de desenvolvimento é importante para prever o curso clínico do paciente e possibilitar precocemente opções mais eficazes de tratamento e acompanhamento.

A busca pelo diagnóstico cada vez mais precoce é essencial para o acompanhamento adequado do paciente e também para assimilação da condição pelos familiares, pois permite a previsão dos comportamentos e habilidades que o paciente poderá ou não adquirir ao longo da vida, e a busca por mais informação, serviços e suporte para o paciente e a família [18].

1.3.1 Etiologia genética das DIs

A identificação das causas genéticas da DI, é essencial para o prognóstico, o manejo e o aconselhamento genético [1]. Estima-se que 25-35% dos casos de DI sejam causados por fatores genéticos, porém devido à complexidade e heterogeneidade fenotípica o estabelecimento de relações genótipo-fenótipo é especialmente complexo (Moeschler, 2010).

Além de alterações cromossômicas, mutações em mais de 450 genes já foram identificadas como causadoras de DI. Esse número sugere a ocorrência de uma diversidade de mecanismos como alteração de vias metabólicas, anomalias celulares, anormalidades proteicas levando a fenótipos de DI. Essa heterogeneidade genética, aliada a heterogeneidade clínica explica a dificuldade de identificação de causa das DIs, frequente em todos os estudos da área (Moeschler, 2010). Adicionalmente, quadros de DI ocorrem junto a um conjunto de fenótipos compondo síndromes distintas.

Outras causas importantes das DIs são anomalias estruturais do cérebro (7-17% dos casos), causas ambientais ou teratogênicas (5-13%), padrões reconhecíveis de malformações (até 7%), doenças metabólicas ou endócrinas (1-5%). Entretanto, boa parte dos casos investigados (30-50%)

permanece com causa desconhecida, o que ressalta a complexidade etiológica das DIs [1].

Para o enfrentamento dessa diversidade e complexidade, deve-se aproveitar o aumento da disponibilidade de exames de alta tecnologia, que só atingem seu máximo potencial quando aliados a uma avaliação clínica profunda (Moeschler, 2010). É imprescindível a análise do histórico médico do paciente, incluindo detalhes pré-natais e referentes ao parto; a história familiar a partir do estudo de três ou mais gerações; a avaliação física, com especial atenção para busca de dismorfologias e malformações; além de uma avaliação neurológica e comportamental para a busca de comportamentos e padrões sindrômicos conhecidos [3].

1.3.2 Alterações cromossômicas como causas de DI

As alterações cromossômicas relacionadas as DIs podem decorrer de duplicação, deleção ou rearranjo (translocações, inversões) do DNA. Elas podem ocorrer em grande escala, envolvendo múltiplos genes, parte ou a totalidade de um cromossomo; ou em microescala, envolvendo um ou poucos genes.

O alto número de ocorrências de DI associadas a outros fenótipos direciona o diagnóstico genético inicialmente para a análise cromossômica. Para o estudo das alterações cromossômicas em grande escala, vêm sendo utilizadas há décadas no campo da genética médica as técnicas de citogenética convencional, capazes de identificar alterações em número ou estrutura cromossômica até o limite de tamanho de 5-10 Mb. A introdução de técnicas de diagnóstico genético molecular, através da utilização de sondas moleculares para sequências específicas do DNA permitiu o avanço do diagnóstico e a identificação de regiões muito menores, chamadas de submicroscópicas, implicadas na etiologia das DIs. O desenvolvimento e aplicação de técnicas cada vez mais sensíveis, em especial a FISH (do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization*) em suas diversas variações e diferentes técnicas de sequenciamento, permitiu a caracterização de diversas

regiões genômicas e a associação dessas a diferentes alterações e síndromes genéticas. O amadurecimento dos estudos em genética clínica trouxe o entendimento de que a variação do número de cópias (CNV- do inglês, Copy Number Variation) de determinados genes levavam às alterações fenotípicas patogênicas.

O desenvolvimento das técnicas moleculares cada vez mais detalhadas, em especial, a análise cromossômica por microarrays (CMA, do inglês *Chromosomal Microarrays*) permite a identificação de CNVs através de buscas por todo o genoma, capaz de identificar macro e micro alterações importantes [19]. O uso mais difundido dessas técnicas e o desenvolvimento de técnicas mais acessíveis e práticas como o MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), tem permitido tanto o desenvolvimento acadêmico quanto o acesso da população às novas tecnologias de promoção do diagnóstico clínico, revolucionando o estudo em genética médica [3].

O estudo das variações do número de cópias tem sido utilizado especialmente na investigação de patologias muito heterogêneas como é o caso das DIs. Diversas microdeleções e microduplicações têm sido caracterizadas ao longo do genoma relacionadas a diferentes níveis de DI associada a outros fenótipos. É bem caracterizado que CNVs maiores estão relacionados a fenótipos mais severos, enquanto a haploinsuficiência gênica é mais frequentemente associada a fenótipos relacionados ao desenvolvimento [20].

1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO

1.4.1 Exame de cariótipo

O exame de cariótipo consiste na análise dos cromossomos, visualizados em células em divisão. Esse exame permite a identificação de aneuploidias (alterações cromossômicas numéricas, como as monossomias e trissomias), grandes alterações estruturais (entre 5-10Mb) e mixoploidias (ocorrência de linhagens celulares geneticamente diferentes, decorrentes de mosaicismo ou quimerismo) [20].

O método menos invasivo e mais utilizado para análise cromossômica constitutiva requer a obtenção de células interfásicas do sangue periférico e da posterior indução da divisão em meio de cultura. Os linfócitos T presentes no sangue entram em divisão facilmente em cultura de células em suspensão em que se adiciona lectinas, sendo a mais utilizada a fitohemaglutinina [20].

Entre 48 e 72 horas, a fitohemaglutinina alcança os picos ótimos de indução da divisão celular, promovendo a divisão em um número maior de células em suspensão. A proporção de células em divisão é mantida através da utilização de inibidores do fuso mitótico que mantêm as células que atingem a fase M do ciclo celular paradas em metáfase [20].

Outra etapa essencial para a obtenção de cromossomos de qualidade é utilização de solução hipotônica para promover o inchaço das células, facilitando a separação dos cromossomos e melhorando a visualização das células após a fixação e preparo de lâminas para microscopia [21].

A técnica de bandamento padrão para análise cromossômica é o bandamento GTG, que consiste em diferenciação das bandas de eucromatina e heterocromatina a partir da digestão controlada dos cromossomos com tripsina, seguida por coloração com Giemsa. Esse bandamento permite a visualização de bandas claras e escuras que permitem a identificação dos cromossomos e a observação de possíveis alterações estruturais [21].

A análise da estrutura dos cromossomos a partir da forma e do padrão específico de bandas, sendo indicada a análise a partir da visualização de

cromossomos que apresentem no mínimo 300 bandas por lote haploide. Os resultados devem ser liberados segundo a nomenclatura internacional atualizada [22].

1.4.2 Exame de MLPA

A técnica de MLPA, através da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR, permite a identificação do número de cópias de uma dada sequência de DNA. Cada sonda tem como alvo uma região específica do DNA e é formada por dois segmentos complementares à sequência alvo (Figura 4). O primeiro segmento é um oligonucleotídeo curto (50-60 pares de bases) que contém uma sequência iniciadora ou *primer* específico para a reação de MLPA. O outro segmento é um oligonucleotídeo mais longo (60-450 pares de bases) que carrega uma sequência coringa com tamanho específico para cada uma das regiões estudadas (Figura 4.1 e 4.2). É a partir de cada uma dessas sequências coringas que as sondas poderão, ao final do experimento, ser separadas e correlacionadas com as regiões cromossômicas investigadas.

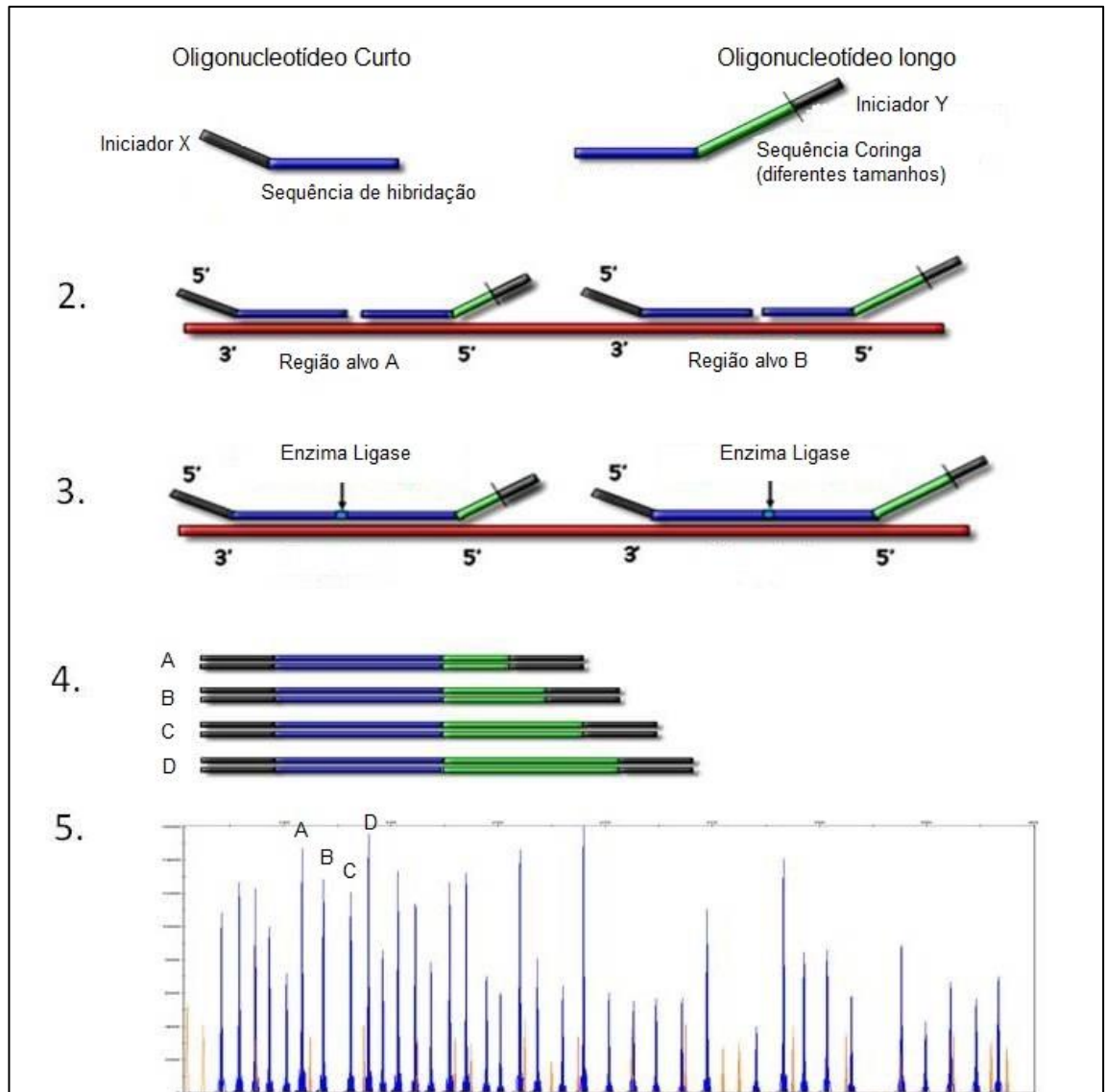


Figura 4. Sequência de realização da técnica de MLPA. Após a denaturação do DNA, as duas partes das sondas hibridam em suas região alvo. Os fragmentos de sonda hibridados são então unidos pela enzima ligase, formando uma sonda completa, de tamanho específico para cada região alvo. As sondas completas de diferentes tamanhos são amplificadas por PCR e posteriormente quantificadas por eletroferograma. Adaptado dos manuais de utilização da MRC-Holland.

Inicialmente, os fragmentos livres de cada sonda devem ser hibridadas ao DNA e em seguida os fragmentos serão unidos por uma ligase (Figura 4.3). Após uma nova desnaturação, as sondas completas (formadas após a ação da ligase, pela união dos fragmentos complementares) devem ser amplificadas por PCR (Figura 4.4). A reação de PCR é realizada a partir da

sequência iniciadora presente em todas as sondas, o que torna a reação mais homogênea e padronizada, facilitando a análise posterior. Os fragmentos formados e amplificados e genotipados.

A análise dos resultados do eletroferograma, cada um dos picos corresponde ao produto da amplificação por PCR de uma sonda específica (Figura 4.5). O eletroferograma de cada amostra é comparado a uma amostra controle. A diferença entre a área sob os picos da amostra e do controle indica a mudança no número de cópias de cada sonda específica (Figura 5).

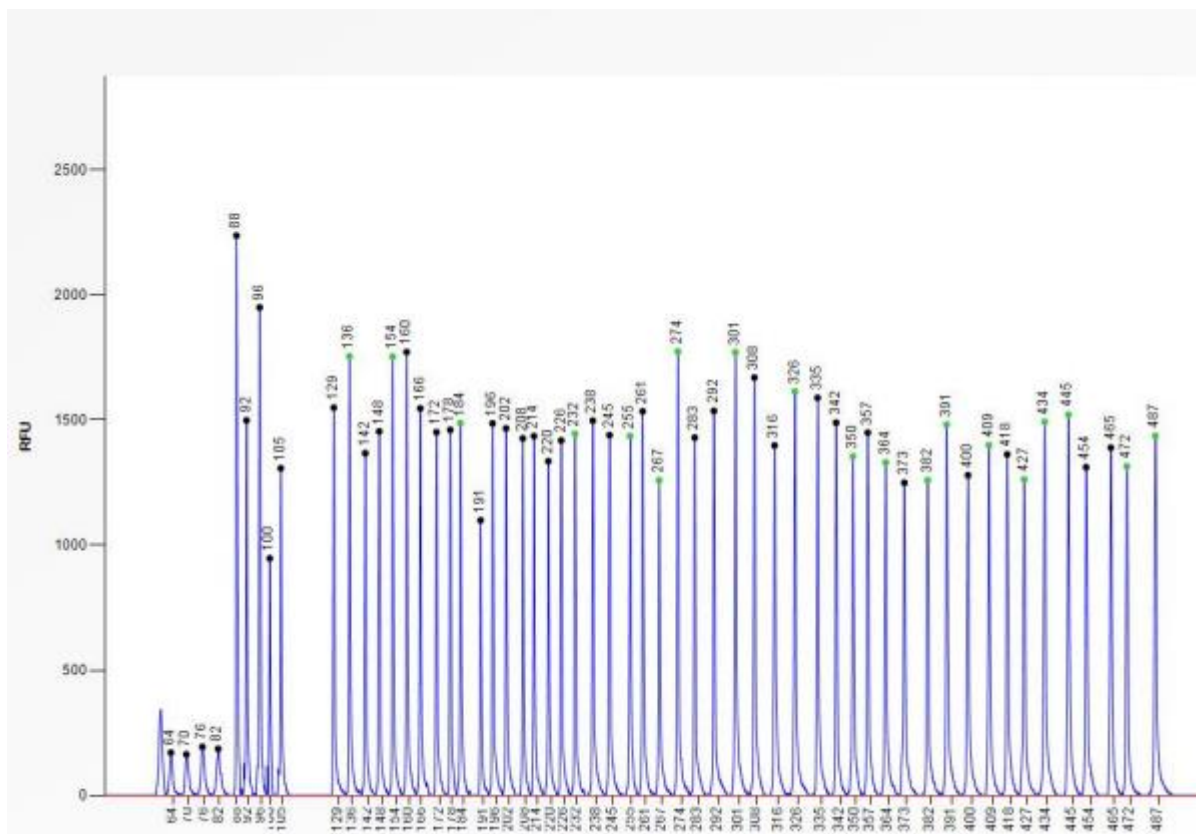


Figura 5. Eletroferograma ilustrativo do kit P250. Cada um dos picos representa a quantificação das diferentes sondas amplificadas. A amostra representa um controle com número de cópias normal para todas as sondas. Em uma amostra com deleção, os picos das regiões deletadas devem apresentar picos menores do que os identificados nesse controle. Adaptado dos manuais de utilização da MRC-Holland.

1.4.3 Análise cromossômica por microarray (CMA)

A análise cromossômica por microarray permite a identificação de microdeleções e microduplicações de 10 a 100 vezes menores que as identificáveis através da análise por microscopia óptica. Além disso, permite a avaliação de todo o genoma do indivíduo através da utilização de um conjunto de sondas - fragmentos selecionados e cujo alvo de hibridização tem a sua localização conhecida - organizadas em um chip de DNA. As sondas presentes no chip interagem de forma locus-específica com a amostra, permitindo a realização de buscas pangenômicas por CNVs nas sequências-alvo avaliadas.

Plataformas de análise de CMA mais modernas detectam ainda polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) identificando as quatro variantes possíveis (A, C, T ou G) na sequência contendo o SNP. O acréscimo de sondas de SNP torna a análise por CMA ainda mais completa por permitir a identificação de regiões de homozigose no genoma, a identificação de mosaicismos e de casos de dissomia uniparental (UPD, do inglês *Uniparental Dissomy*) [23].

1.4.4 Interpretação das variações no número de cópias

A variação no número de cópias é uma forma de variabilidade genética em que determinada região genômica apresenta número de cópias maior ou menor podendo ocorrer na forma de deleções, inserções ou duplicações que podem ou não ser transmitidas para outras gerações. Utiliza-se o termo CNV (do inglês, *Copy Number Variation*) para descrever os segmentos de DNA com tamanho maior ou igual a 1kb e que apresenta variação no número de cópias quando comparado com um ou mais genomas de referência. Os CNVs não são necessariamente patogênicos e podem influenciar a predisposição de mudanças genéticas adaptativas ou deletérias compondo, portanto, um importante mecanismo evolutivo [24].

Para a interpretação dos CNVs é essencial a comparação das variações com bancos de dados genômicos como UCSC Genome Browser, ENSEMBL, DECIPHER e DGV (do inglês, *Database of Genomic Variation*, disponível em <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) [25]. Destaca-se a importância do DGV que agrega a descrição de milhares de variações estruturais presentes em indivíduos controle de diversas populações do mundo, auxiliando na identificação de CNVs benignas. Em paralelo o DECIPHER (do inglês, *Data base of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*, disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk/>) reúne dados de CNVs encontrados em indivíduos estudados em todo o mundo e os relaciona com os fenótipos desses indivíduos, ajudando na classificação de variações com potencial patogênico. Outro banco de dados importante é o OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man database*, disponível em <http://www.omim.org/>), que detalha os genes humanos já descritos e os fenótipos a eles relacionados, destacando inclusive os genes conhecidamente mórbidos [25].

A utilização dos bancos de dados permite uma compreensão rápida do potencial benigno ou patogênico do CNV encontrado, entretanto essa classificação requer a observação de critérios gerais que estão detalhados na Tabela 3.

ACHADOS E CRITÉRIOS OBSERVADOS NO CNV	INDICAM QUE O CNV É POTENCIALMENTE:	
	Patogênico	Benigno
Deleção	X	
Deleção em homozigose	X	
Duplicação		X
Amplificação (ganho de mais de uma cópia)	X	
Rico em genes	X	
Poucos genes		X
Contém genes OMIN mórbidos	X	

Envolve apenas elementos regulatórios	X
Presente em bases de dados de indivíduos saudáveis (por exemplo, DGV)	X
Presente em bases de dados de indivíduos alterados (por exemplo, DECIPHER)	X
Em região já relacionada a uma síndrome	X
Presente em parente alterado	X
Presente em parente saudável	X
Herdado de um genitor saudável	X
Herdado de um dos genitores de forma expandida ou alterada	X

Tabela 3. Critérios gerais de investigação da patogenicidade dos CNVs. Para a validação dos achados cada um dos critérios deve ser aprofundado analisando os diversos bancos de dados disponíveis, casos descritos na literatura e especificidades do caso estudado. Adaptado de [26].

Após a avaliação dos critérios gerais e do detalhamento de cada caso as CNVs podem ser consideradas benignas, que abarca as variações benignas descritas em indivíduos controle e as variações polimórficas presentes em aproximadamente 1% da população geral. As CNVs patogênicas podem ser subclassificadas em: CNVs patogênicas causais, em que a alteração identificada tem clara correlação com o fenótipo do paciente ou a suspeita clínica (por exemplo, deleção 5p15.2 em paciente com suspeita de Síndrome de Cri-du-chat- OMIM 123450); CNVs patogênicas imprevistas, em que a alteração, apesar de ser patogênica, não explica o quadro do paciente; CNVs patogênicas *loci* susceptíveis, para variações relacionadas a desordens com ampla heterogeneidade ou expressividade variável [25].

As CNVs também podem ser descritas como Possivelmente Patogênicas, nos casos em que é possível identificar genes relevantes na região da variação, que não ocorrem na população em geral, mas que ainda não estão relacionadas à uma síndrome ou padrão fenotípico. Temos ainda a classificação da CNV como VOUS

(do inglês, Variants Of Unknown Significance) que descreve as variações em que não se dispõe de evidências suficientes para classificá-las como benignas ou patogênicas [21].

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo identificar a contribuição das técnicas de cariótipo, MLPA e CMA para o diagnóstico genético de pacientes com CC e Dle e outras possíveis malformações congênitas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer a taxa de diagnóstico de cada uma das técnicas utilizadas
2. Identificar alterações genéticas capazes de explicar o quadro clínico dos pacientes estudados.

3. MÉTODOS

3.1 ENCAMINHAMENTO DOS PACIENTES

Os pacientes que fazem parte desse estudo foram selecionados nos anos de 2014 e 2015 nos Ambulatórios de Genética do Hospital Universitário da Universidade de Brasília-HUB e do Núcleo de Genética da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal-NUGEN/SES/DF. As instituições de saúde participantes foram convidadas a encaminhar para esse estudo pacientes que apresentassem diagnóstico de CC associada a quadro indicativo de ADNPM/DI, com ou sem outros sinais dismórficos. Durante o atendimento, após anamnese, os médicos geneticistas expuseram de forma acessível, o mérito e objetivos do projeto. Foram detalhados aos responsáveis legais pelos pacientes o procedimento de retirada e do destino da amostra de sangue, e a questão do sigilo sobre a identidade do paciente e sobre o uso de imagens. Finalmente, disponibilizaram para assinatura o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) àqueles que concordaram em participar do estudo.

O presente estudo faz parte do projeto aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 081/2009; 25/11/09).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- 1) Paciente com indicação clínica de CC associada a DI;
- 2) Assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes/responsáveis legais;

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- 1) Síndrome genética definida;
- 2) Não concordância em participar do estudo ou na assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

3.4 GRUPO AMOSTRAL

Ao todo, foram indicados 46 pacientes para participação no estudo. Após a avaliação das indicações segundo os critérios de inclusão e exclusão do estudo foram selecionados 20 pacientes de ambos os sexos portadores de DI e portadores de cardiopatias congênitas, sem diagnóstico de síndrome genética definida.

3.5 MATERIAL BIOLÓGICO:

Foram coletadas 2 amostras de sangue periférico por punção venosa de cada paciente: Uma em tubo contendo Heparina, para exame de cariótipo outra, em tubo contendo ácido etileno diamina tetracético (EDTA) destinada à extração de DNA para realização dos exames moleculares (MLPA e/ou microarray).

As amostras foram então submetidas ao exame de Cariótipo para a exclusão de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, e ao exame de MLPA para a análise de alterações na região 22q11.2 associada às síndromes do Olho de Gato, DiGeorge e Velocardiofacial. As amostras em que não foram identificadas alterações nos exames de Cariótipo e MLPA foram então processadas para análise por microarray, sendo assim composto o fluxograma de exames do estudo (Figura 6).

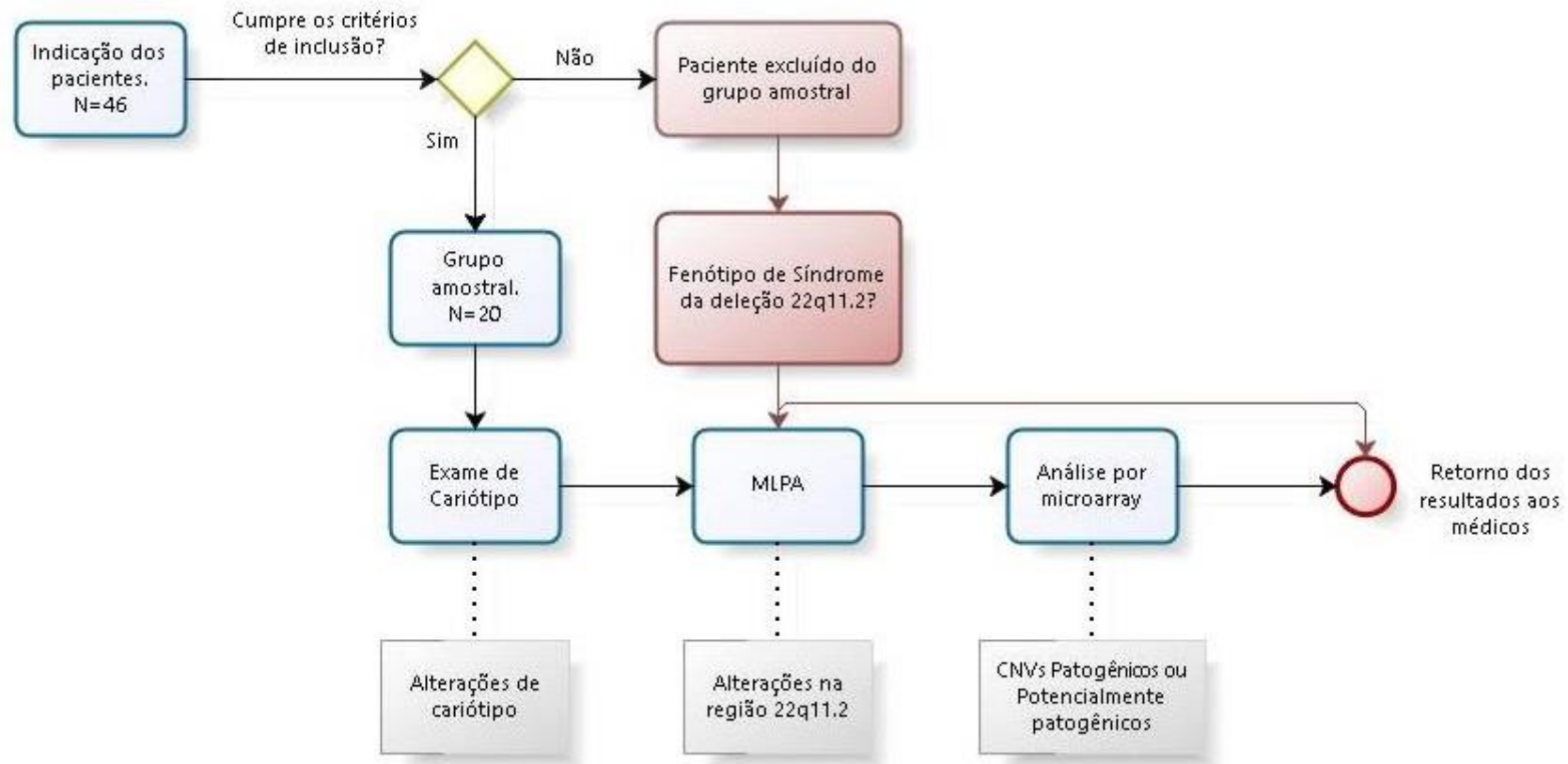


Figura 6. Fluxograma de diagnóstico do estudo. Após a triagem dos pacientes indicados foi estabelecido o grupo amostral. Em respeito à indicação dos médicos, os pacientes retirados do grupo amostral tiveram suas amostras avaliadas por MLPA (em vermelho). O diagnóstico do grupo amostral foi processado na ordem ilustrada. Quando o exame utilizado apresentava resultado normal, a amostra era direcionada para o exame diagnóstico seguinte. Após a comparação dos achados com os dados clínicos do paciente os

resultados foram encaminhados para os médicos geneticistas encarregados da instrução, aconselhamento e encaminhamento dos pacientes/responsáveis.

3.6 EXAME DE CARIÓTIPO

3.6.1 Cultura celular

A amostra de sangue deve ser acondicionada em tubo heparinizado. A cultura de linfócitos é realizada em frasco para cultura de células em suspensão estéril, em meio composto por 90% meio de cultura RPMI 1640 contendo L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Ao meio de cultura deve ser acrescido 60 U/mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e Fitohemaglutinina A (2%). Acrescenta-se 1mL de sangue total, e deve-se manter incubação por 72 horas a 37° C para crescimento celular.

Para a aquisição das metáfases, após o período de incubação é acrescentado 4.10^{-5} M de Colchicina (que tem a função de induzir a parada na etapa de metáfase das divisões celulares presentes na cultura) mantendo-se o material em estufa a 37° C por mais 25 minutos. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, deve-se realizar etapa de hipotonização por homogeneização cuidadosa da amostra utilizando KCL (0,075M) a 37° C, seguida de nova incubação a 37° C por 20 minutos. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, inicia-se a etapa de fixação utilizando Fixador de Carnoy I (3:1 Álcool Metílico/ Ácido Acético Glacial), sendo indicada a fixação, centrifugação e descarte de sobrenadante por quatro vezes.

Após essa etapa, deve-se gotejar o material fixado em lâminas para microscopia. Essas devem ser envelhecidas durante 5 dias, quando foram submetidas ao Bandamento G, banhando as lâminas nas soluções de 5% Tripsina; 10% de soro fetal bovino; 20% de meio RPMI; e 20% de solução-tampão salina de Hank (tampão HBSS), em seguida deve-se corar com Giemsa (3%).

3.6.2 Análise dos Cariótipos

A análise em microscópio dos Cariótipos foi realizada no Laboratório de Genética Clínica da UnB e no Laboratório de Citogenética do Núcleo de

Genética da SES/GDF. A análise foi realizada em banda GTG, em amostras de 300-550 bandas por lote haploide. Para cada paciente foi realizada a análise estrutural detalhada de no mínimo 5 metáfases e a contagem numérica de no mínimo 20 metáfases. Casos em que havia suspeita de mosaicismo ou de alteração dos cromossomos sexuais tiveram sua contagem mínima ampliada para 50 metáfases, buscando uma caracterização mais precisa da alteração. A análise e a descrição dos cariótipos foram realizadas conforme as indicações do *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* [27].

3.7 EXAMES MOLECULARES

3.7.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico preservadas em EDTA, utilizando o método Puregene – “Salting out”.

Para a lise celular foi utilizada solução de lise contendo, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8,0; e 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS; seguida de centrifugação a 3400 G por 10 minutos. Em seguida aplicou-se 1 mL da solução de precipitação de proteína, contendo 7,5 M de NH₄ Ac., seguida de centrifugação a 3400 G por 10 minutos. Esse procedimento fez com que as proteínas presentes no lisado celular se precipitassem, formando um pellet.

O sobrenadante livre de proteínas foi então transferido para outro eppendorf contendo 1mL de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente várias vezes até que fosse possível identificar a formação do novelo de DNA. Em seguida, centrifugou-se a amostra à 3400 G por 3 minutos para a formação de pellet contendo o novelo de DNA. Após a retirada do sobrenadante, adicionou-se 1 ml de Etanol Absoluto. O tubo foi novamente centrifugado a 3400 G por 3 minutos, o sobrenadante descartado, e o tubo

contendo o DNA extraído foi deixado aberto na capela de fluxo laminar, secando à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a secagem, foram aplicados 200 µl de TE 1x, e armazenou-se o DNA a -8°C.

As quantificações foram realizadas no espectrofotômetro Nanovue® (GE), obtendo-se razão de 260/280 nm de pureza da amostra. Utilizando o Qubit® (Life Technologies) as amostras foram quantificadas e preparadas as diluições necessárias para aplicação de cada uma das técnicas moleculares.

3.7.2 Exame de MLPA

A técnica de MLPA foi realizada utilizando kit P250 (MRC-Holland) que contém 29 sondas diferentes para a região 22q11, além de sondas nas regiões 4q35, 8p23, 9q34, 10p14, 17p13 e 22q13, já associadas às síndromes do Olho de Gato, DiGeorge e Velocardiofacial.

As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Nanovue® (GE), obtendo-se razão de 260/280 nm de pureza e concentração de 50 ng/µL. Alíquotas de 5 µL cada amostra foram denaturadas 94°C (5 minutos). A cada amostra foi aplicado 1 µL de Master Mix contendo para cada reação 0,375 µL de Probe Mix, 0,375 µL de tampão Salsa Buffer e 0,25 µL de água DNase free, homogeneizando por pipetagem. A reação de hibridação das sondas foi realizada com ciclos de 95°C (1 minuto) seguido de 60°C (3 horas). Após o anelamento das sondas e DNA, foi aplicado 8 µL de Master Mix de ligação contendo para cada reação 0,75 µL de Ligase Buffer A, 0,75 µL de Ligase Buffer B, 6,25 µL de água DNase free e 0,25 µL de enzima Ligase. A reação de ligação seguiu o programa de ciclo a 54°C (15 minutos), 98°C (5 minutos) e 20°C (20 minutos). Em preparação para a PCR (do inglês, Reação em Cadeia de Polimerase), foi aplicado em cada tubo 5 µL de Mix de PCR contendo para cada reação 0,6 µL de Primer, 4,15 µL de água DNase free e 0,25 µL de enzima Taq polimerase, seguido de homogeneização por pipetagem. O programa da PCR utilizada consiste em 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 60°C (30 segundos), 72°C (1 minuto) e um último ciclo de 72°C (20 minutos), O produto da PCR foi diluído na proporção de 1:10, sendo

disposto em placa de 96 poços 1 μ L de cada amostra diluída, acrescidos de 9 μ L de Formamida HIDI e 0,01 μ L de marcador Liz-500, para cada poço da placa.

Os fragmentos formados e amplificados distribuídos na placa foram submetidos à eletroforese capilar no analisador genético ABI-3130. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software “Coffalyser” (MRC-Holland).

3.7.3 Análise por CMA

As amostras dos pacientes em que não foram identificadas alterações cromossômicas utilizando o Cariótipo e a técnica de MLPA foram submetidas a análise cromossômica por microarray. Foi utilizada a plataforma CytoScan™ 750k (Affymetrix), que contém cerca de 500.000 sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano e cerca de 250.000 SNPs, permitindo uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto de perda de heterozigose.

Os procedimentos de purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizados conforme descrição do fabricante. O DNA genômico (50 ng/ μ L) do paciente mais um controle negativo e um controle positivo (fornecido pelo fabricante), foi digerido pela enzima de restrição NspI, seguindo as recomendações do fabricante (Affymetrix). Depois de digeridas, as amostras foram ligadas a adaptadores e em seguida, um primer universal que reconhece a sequência do adaptador ligado ao DNA genômico foi utilizado para amplificar as sequências obtidas por meio de PCR. A programação da PCR utilizada consiste em um ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos), otimizando a reação para amplificar preferencialmente fragmentos de 150 - 2.000 pb de comprimento, que foram confirmados posteriormente em gel de agarose a 2% em TBE 1X. Em seguida estes produtos foram purificados utilizando beads magnéticas e após a lavagem para retiradas das beads, o material foi quantificado no

espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare Life Science). Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. O passo seguinte foi a fragmentação das amostras purificadas em 50 - 200 pb, que em seguida foram confirmados em um gel de agarose a 4 % em TBE 1X, a um campo elétrico com voltagem constante de 10 V/cm, por 1 h.

Os fragmentos de DNA com 50 - 200 pb foram revelados pela coloração do gel em solução de brometo de etídeo (5 mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando o sistema de vídeo-documentação/ImageMaster® (VDS – Video-documentation System) (Pharmacia Biotech.). Seguindo o protocolo, os fragmentos de DNA foram marcados por terminal com deoxynucleotidyl transferase e então aplicados no Affymetrix GeneChip® e hibridados por 16 - 18 horas a 50 °C e 60 G no GeneChip® Hybridization Oven 645 (Affymetrix). Os chips foram então lavados e corados na GeneChip® Fluidic Station 450 (Affymetrix) e escaneados no GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) operados pelo Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC, Versão 3.2.2). A partir daí foram gerados arquivos “CEL” que foram convertidos em “.CYCHP” para serem lidos e analisados no Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) 2.0 software.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os critérios de indicação para participação na pesquisa (pacientes portadores de cardiopatias congênitas e ADNPM/DI) foram checados para cada um dos pacientes. Após triagem e avaliação completa realizada por médicas e médico geneticistas, os responsáveis pelos pacientes foram apresentados à proposta de pesquisa e convidados a participar, realizando a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE. Preenchidos os critérios de inclusão, iniciamos a realização do fluxograma de exames diagnósticos proposto: cariótipo, análise por MLPA e análise por microrray para cada um dos pacientes selecionados. Um total de 20 pacientes foram indicados para a pesquisa após avaliação especializada em genética médica. Os resultados gerais estão apresentados na Tabela 4.

PACIENTE	CARIÓTIPO	MLPA	CMA	CLASSIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO	TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO
P1	46, XX [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P2	46, XY [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P3	46, XX [20]	Sem alterações	Deleção 3q26.32: arr [hg19] 3q26.32 (176,025,379-177,377,006)- 1,3Mb	Patogênica	CMA
P4	46, XY[20]	Sem alterações	Duplicação 8p11.1q11.1: arr[hg19] 8p11.1q11.1(43,161,631- 46,839,736)x3, de 3,6Mb	Patogênica	CMA
P5	46, XY[20]	Sem alterações	Duplicação 6p25.3p25.1: arr[hg19] 6p25.3p25.1(156,974-5,608,374)x3, de 5,45 Mb. Deleção na região 20q13.33 arr[hg19] 20q13.33(61,541,210- 62,913,645)x1, de 1,37Mb.	Patogênica Patogênica	CMA
P6	47, XY,+mar[17]. 46, XY[13]	Sem alterações	Normal	Benigna*	CARIÓTIPO
P7	46, XY[20]	Sem alterações	Normal	Benigna	-
P8	46, XX [30]	Sem alterações	Normal	Benigna	-
P9	46, XY [30]	Deleção 22q11.2-rsa	Não realizado	Patogênica	MLPA

		22q11.2(P250)x1			
P10	46,XY [30]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P11	46,XY [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P12	46,XY [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P13	46,XY [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P14	46,XY [20]	Deleção 22q11.2-rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P15	46,XX [50]	Sem alterações	Duplicação em 19p13.3, arr[hg19] 19p13.3(1,589,635-1,791,086)x3, de 201,4 Kb.	VOUS	CMA
P16	46,XX [30]	Sem alterações	Sem alterações	Benigna	-

P17	46, XX [30]	Sem alterações	Sem alterações	Benigna	-
P18	48, XXXX[46], 47,XXX[4]	Sem alterações	Não realizado	Patogênica	CARIÓTIPO
P19	46,XX,[20]	Deleção 22q11.2- rsa 22q11.2(P250)x1	Não realizado	Patogênica	MLPA
P20	46, XY[20]	Sem alterações	Deleção em 3q22.3 arr[hg19] 3q22.3(138,353,082- 138,443,213)x1, de 90Kb.	Potencialmente patogênica	CMA

Tabela 4. Resumo das alterações identificadas em todos os pacientes analisados e identificação da técnica em que a alteração foi identificada. *O cromossomo marcador identificado em cariótipo convencional foi considerada uma alteração benigna por não terem sido identificadas CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas no CMA. Essa alteração cromossômica requer a realização de outros exames para sua melhor caracterização.

A análise dos pacientes investigados revela que a média de idade dos pacientes é de 6,38 anos. Essa média corrobora a informação da literatura de que síndromes que apresentam CC e DI são usualmente diagnosticadas na infância [29]. Identifica-se também maior frequência de pacientes do sexo masculino no estudo (60%). Esse desvio provavelmente se deve à maior prevalência de DI em indivíduos do sexo masculino [1].

A partir da aplicação do fluxograma de exames proposto (Cariótipo, MLPA e microarray) foi possível identificar alterações cromossômicas que expliquem o quadro clínico dos pacientes em em 75% dos casos (15 de 20). Nos três diferentes exames propostos foram identificadas alterações, resultando em uma capacidade diagnóstica descrita na Figura 7.

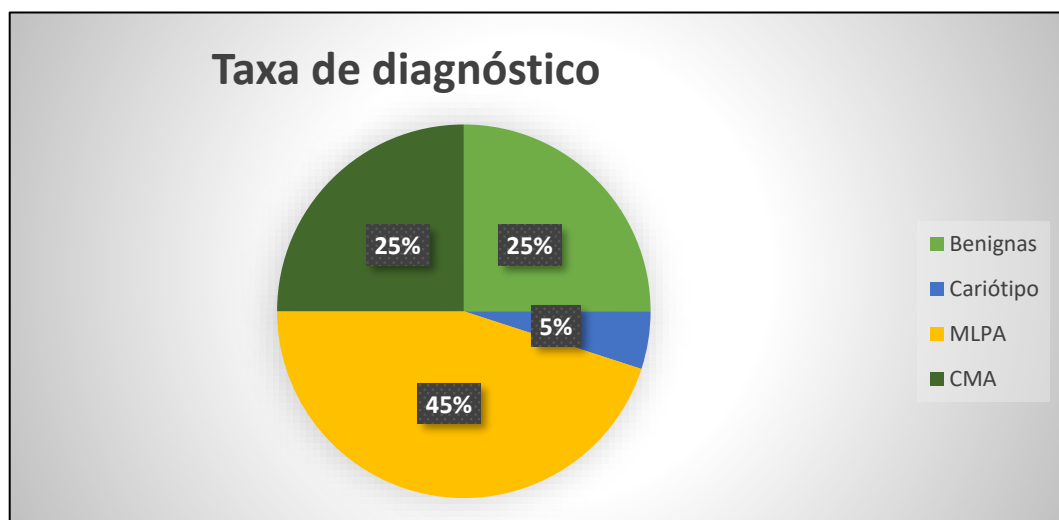


Figura 7. Taxa de diagnóstico de alterações patológicas após a aplicação do fluxograma proposto.

Apenas 25% pacientes que passaram pelo conjunto de exames diagnóstico permaneceram sem alteração genética identificada que explique o quadro clínico do paciente. Demonstra-se, portanto, eficiência do fluxograma proposto para o diagnóstico de pacientes selecionados. A porcentagem de pacientes em que não foram identificadas alterações patológicas (25%) é compatível com presente na literatura para deficiências intelectuais idiopáticas (30%) [30]. Para esse conjunto de pacientes é indicada a aplicação de exames diagnóstico capazes de detectar

mutações patogênicas que possam explicar o quadro clínico, como, por exemplo, o sequenciamento de exoma.

A ordem proposta para a realização dos exames leva em conta o tamanho das alterações que cada exame permite identificar, indo do cariótipo que detecta alterações maiores, até 5-10Mb, até o micrarray capaz de identificar alterações de poucas dezenas de pares de bases. O fluxo proposto leva em conta também o custo para a realização dos exames, de modo que o exame de maior custo utilizado, a análise por microarray, só foi realizado para os casos em que não foi possível identificar alterações utilizando os outros exames propostos, que corresponde nesse estudo a 50% dos pacientes estudados.

É importante ressaltar que a eficiência do exame de cariótipo convencional para detectar alterações patogênicas em pacientes portadores de DI e CC está subestimada, levando em conta que não foram indicados para esse estudo pacientes com suspeita de Síndrome de Down, Turner, Patau, Edwards, entre outras aneuploidias usualmente identificadas com facilidade. Além disso, a alteração cromossômica identificada no paciente P6 que consiste em um cromossomo marcador foi considerada benigna a partir das técnicas utilizadas. A aplicação de outras técnicas pode levar a uma nova interpretação do caso. O número de pacientes diagnosticados com Síndrome da Deleção 22q11.2 (9 pacientes de 20) corrobora a importância da investigação dessa microdeleção que é a mais comum em humanos [31], especialmente em pacientes portadores de CC e DI na infância, e que apresentem outras dismorfias características da síndrome. A taxa de diagnóstico de 45% dos pacientes a partir da técnica de MLPA ressalta a eficácia dessa técnica para o diagnóstico genético. Apesar de não apresentar a extensa capacidade de investigação do genoma como os CMAs, a aplicação nesse estudo confirma as indicações da literatura de que a técnica de MLPA permite identificar economicidade e praticidade alterações cromossômicas recorrentes em pacientes com quadros patogênicos clinicamente bem delimitados, como é o caso da deleção 22q11.2 nesse grupo de pacientes que apresentam CC e DI/ADNPM[21].

4.1 SINAIS E SINTOMAS DOS PACIENTES ESTUDADOS

Os pacientes do grupo amostral apresentaram uma grande variedade de fenótipos clínicos a Tabela 5 resume as informações e os sinais identificados em cada paciente.

PACIENTE	SEXO	IDADE	CC	DI	SINAIS E SINTOMAS
P1	F	5 anos	PCA	ADNPM	Fendas palpebrais oblíquas e curtas, nariz bulboso, retrognatia, palato ogival, perda auditiva mínima à esquerda, hipotonia
P2	M	5 anos	CIA, CIV, PCA, TI	ADNPM	Sobrancelhas espessas, microretrognatia, hipertrofia gengival, palato ogival, orelhas proeminentes e rotacionadas para trás, dedos supreanumerários pós-axiais bilaterais, hipocalcemia, hidronefrose
P3	F	7 anos	ASD, PCA, VSD	ADNPM e atraso de fala	Epicanto e telecanto bilaterais, baixa implantação de orelhas, rotacionadas para trás, raiz nasal baixa, braquidactilia e clinodactilia de quintos dedos bilateralmente, malformação de Chiari I.
P4	M	Óbito aos 5 meses	DORV, HAA, HLH, PVM	ADNPM	Hipertricose em frente, estreitamento bitemporal, orelhas com rotação posterior e horizontalização de lóbulos, hemangioma plano em pálpebra, bilateralmente, raiz nasal média, hipoplasia de asas nasais, palato ogival, pescoço curto com pele redundante, dedos dos pés alargados e alongados, especialmente o hálux, hidronefrose bilateral.
P5	M	3 anos	CIA, CIV, DORV, PA, TOF	ADNPM	Microcefalia, fronte abaulada, hipertelorismo, raiz nasal baixa, narinas antevertidas, microretrognatia, macroglossia, palato ogival, boca “em forma de carpa”, implantação baixa de orelhas, mãos com prega única bilateralmente, epilepsia.
P6	M	3 anos	CIA	ADNPM	Fendas palpebrais curtas, raiz nasal baixa, lábio superior fino, horizontalizado, levemente curvado para baixo, palato ogival,

					orelhas com sobredobramento de hélices, <i>pectus excavatum</i> e braquidactilia nas mãos, baixo peso, dificuldades de deglutição
P7	M	14 anos	TI	ADNPM e dificuldade escolar	Fendas palpebrais oblíquas, orelhas pequenas e leve <i>pectus excavatum</i>
P8	F	34 anos	CIVs, DC, PCA, PVM	DI leve	Hipotelorismo ocular, fendas palpebrais retas, nariz com ponte abaulada e ponta globosa, filtrum longo, boca reta, orelhas de implantação baixa, pescoço alado bem longo, protrusão de externo, quinto dedo curto bilateral, <i>situs inversus partialis</i> . Diagnóstico clínico de Síndrome de Kartagener ou Discinesia ciliar primária
P9	M	3 anos	CIA, TOF, PA	ADNPM	Fontanela anterior, braquicefalia, hipertricose, fendas palpebrais horizontais estreitas, orelhas rotadas posteriormente, normoimplantadas com sobredobramento de hélice, pé torto congênito bilateral, hipocalcemia
P10	M	3 anos	AGVP, TOF	ADNPM	Hipocalcemia grave, hipoglicemia, hipoanatemia
P11	M	7 anos	TOF, IVT	DI e Atraso de fala	Epicanto bilateral, fendas palpebrais pequenas, nariz de base larga, dorso nasal elevado
P12	M	12 anos	PLSVC, RSAA	ADNPM e Atraso de fala	Fronte ampla, facies longa e triangular, sobrancelha arqueada rala, olhos fundos orelhas proeminentes e escafa da hélice ampla com hipoplasia de lóbulo. Filtro nasal curto com columela curta e nariz bulboso, hipertrofia gengival, amelogenese imperfeita, ausência de unidades dentárias, com possível oligodontia, deficiência de alfa-1-antripsina (PiZZ), rinite alérgica persistente e hipocalcemia.

P13	M	5 anos	CIV, PS	ADNPM	Face triangular, sobrancelhas retas, apêndices auriculares bilaterais, orelhas pequenas e proeminentes, narinas antevertidas, rins policísticos, baixo peso e baixa estatura
P14	M	11 meses	AGVP, CIA, TOF	ADNPM	Microcefalia, dorso nasal alto, orelhas com baixa implantação e rotadas posteriormente, com sobredobramento de hélices, retrognatia, prega palmar única à esquerda, clinodactilia de quintos dedos das mãos, hidronefrose e rim direito multicístico
P15	F	Óbito aos 5 meses	FOP	ADNPM	Micrognatia, hipotonia e sialorréia, disfagia orofaríngea grave, hipotonia de estruturas orofaríngeas
P16	F	2 anos	CIA, PCA, TI	ADNPM	Crânio com proeminência biparietal, epicanto bilateral e aparente telecanto, raiz nasal larga e baixa, palato ogival, pectus carinatum, encurtamento de quarto dedo a direita, hálux largo.
P17	F	7 anos	DSAV parcial com agenesia de valva atrioventricular	ADNPM e ASD	Ptose palpebral bilateral, hipoplasia de face média, palato ogival, boca entreaberta, nariz com base alta e dorso alargado, implantação assimétrica de orelhas, estando a esquerda posicionada mais alta que a direita, prega palmar pouco marcada, incompleta bilateral, alterações cerebrais: afilamento do Joelho e do corpo caloso, discreta ectasia dos ventrículos laterais.
P18	F	2 anos	CIA	ADNPM	Microcefalia, ptose palpebral a direita, palato ogival, orelhas baixo implantadas, rotacionadas para trás, com sobredobramento de hélices, fissura posterior de laringe, clinodactilia de quinto

					quirodáctilo bilateral, frouidão ligamentar, baixa estatura, baixo peso, hipotonia generalizada, hipocalcemia, epilepsia.
P19	F	4 anos	COA, FOP, PCA	DI, ASD e Atraso de fala	Microcefalia, hipertricose frontal, orelhas proeminentes, <i>pectus excavatum</i> , pele frouxa redundante em mãos e pés (suspeita de <i>cutis laxa</i> tipo II-B) e hiperextensibilidade articular.
P20	M	10 anos	CIA, CIV	ADNPM	Hipotelorismo ocular, orelhas pontiagudas, raiz e dorso nasal altos, face triangular, hidronefrose congênita bilateral

Tabela 5. Resumo do grupo amostral avaliado e seus sinais e sintomas.

4.2 RESULTADOS ALTERADOS NA ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA

Todos os 20 pacientes realizaram Exame de Cariótipo em sangue periférico com técnica de bandas GTG. Em dois pacientes foram identificadas alterações de cariótipo.

P6

O exame de cariótipo apresentou resultado que demonstra a presença de marcador 47, XY, +mar[17]/46, XY[13], em padrão de bandas GTG, de 400 bandas por lote haploide. Durante a análise não foi possível identificar padrão de bandas no cromossomo marcador, indicando forte possibilidade de conter apenas região de heterocromatina.

O exame de MLPA teve resultado normal.

A análise por microarray revelou apenas CNVs benignas, já descritas como polimorfismos. Nessa análise não foram identificadas alterações que possibilitem a identificação da origem do cromossomo marcador, confirmando a suspeita inicial de que o mesmo seja composto apenas de heterocromatina pericentromérica. Portanto, a presença do cromossomo marcador não explica o quadro clínico do paciente.

Os cromossomos marcadores são definidos como cromossomos supranumerários que não podem ser inequivocamente caracterizados [32]. A patogenicidade dos marcadores está relacionada ao seu conteúdo, sendo indicado o uso de técnicas que permitam identificar o conteúdo gênico presente. Tipicamente, os marcadores que contém cromatina autossômica pericentromérica são considerados não patogênicos [33].

Uma alternativa econômica e interessante para confirmar a presença de heterocromatina pericentromérica no cromossomo marcador seria realizar o cariótipo com bandamento C com hidróxido de bário. Entretanto não foi possível realizar essa análise até a finalização desse estudo.

Para confirmar a origem desse cromossomo marcador indica-se a aplicação de outras técnicas. A análise por CMA dessas regiões pericentroméricas é complexa devido à estrutura dessa região genômica e à menor cobertura de sondas nessa região. O uso de diferentes técnicas, como a FISH, têm elucidado a importância da

região pericentromérica em relação a diversas patologias, como por exemplo a associação entre polimorfismos na região pericêntrica do cromossomo 9 e casos de deficiência intelectual [34]

Uma alternativa econômica e interessante para confirmar a presença de heterocromatina pericentromérica no cromossomo marcador é o cariótipo com bandamento C com hidróxido de bário. Entretanto não foi possível realizar essa análise até a finalização desse estudo.

P18

Para a paciente P18, o cariótipo determinado foi 48, XXXX[46], 47,XXX[4]. A suspeita médica inicial era de Síndrome da deleção 22q11.2, porém o exame de MLPA apresentou resultado normal.

Tendo em vista a raridade da tetrassomia X (apenas 60 casos identificados no mundo) e a recorrência de casos envolvendo mosaicismos diversos é difícil delimitar um quadro fenotípico relacionado à alteração encontrada. As alterações mais frequentemente relatadas nos poucos casos descritos são DI, anormalidades de altura, microcefalia, anomalias de esqueleto/membros e CC, sendo relatado para todos os casos a persistência do ducto arterioso [32]. Trata-se, portanto, de um caso excepcional de anomalia de septação cardíaca em paciente portadora de tetrassomia/trissomia do X.

A trissomia do cromossomo X está relacionada a não-disjunção em meiose materna em 90% dos casos, a tetrassomia parece estar relacionada à não-disjunção sequencial, ocorrendo em ambas as divisões meióticas que levam à formação dos gametas maternos. Para os casos de polissomia do X estão bem descritas a infertilidade e em mulheres, há ainda diminuição da função ovariana [32]

O mosaicismo apresentado, a coexistência de linhagens celulares com diferenças cromossômicas em um mesmo embrião, é causado por erro mitótico durante a embriogênese. Quanto mais cedo no desenvolvimento do embrião ocorrer, maior a proporção de células cromossomicamente alteradas [35].

Todos os demais pacientes apresentaram cariótipo normal em número e estrutura, conforme a Tabela 4.

4.3 RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO POR MLPA- PORTADORES DA SÍNDROME DA DELEÇÃO 22Q11.2.

Os portadores da Síndrome da deleção 22q11.2 foram identificados a partir da técnica de MLPA, utilizando o kit P250 (MRC-Holland).

A partir da técnica de MLPA foram identificadas alterações em 9 dos 20 pacientes que fizeram parte desse estudo.

Dos 9 pacientes em que foi identificada a deleção 22q11.2 por MLPA, 8 apresentam a deleção de tamanho típico, conforme demonstra a Figura 8 e o exemplo apresentado na Figura 9 de resultado compatível com os pacientes P1, P2, P9, P10, P11, P12, P13 e P14. Em um paciente (P19) foi identificada deleção também na região 22q11.2 porém de tamanho menor que a deleção típica.

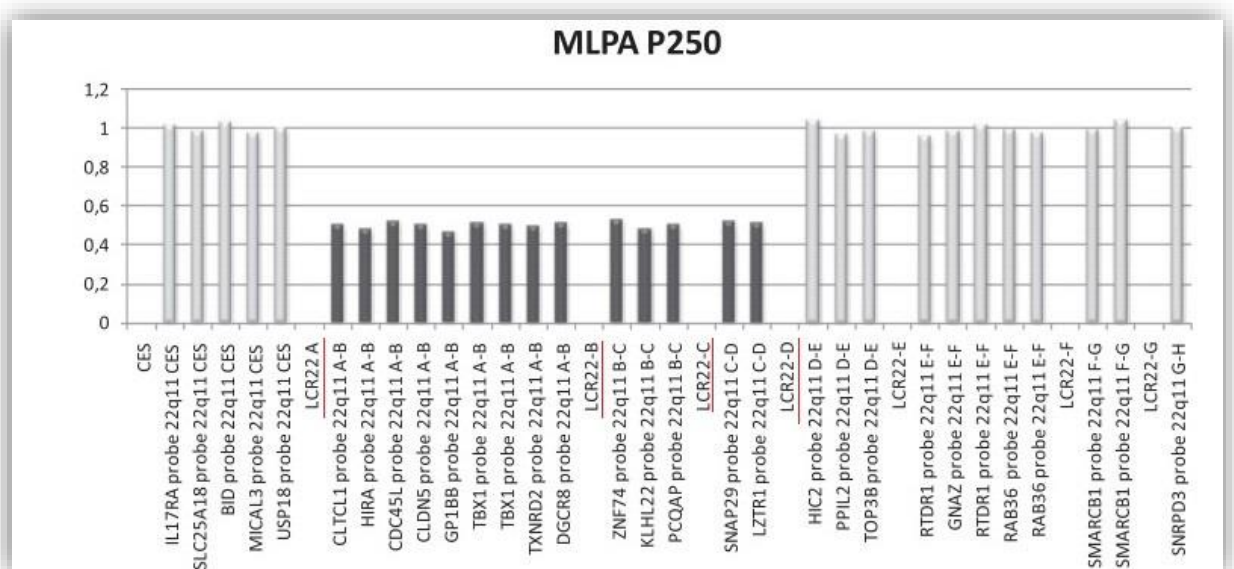


Figura 8. Visualização da deleção típica de 3Mb na região 22q11.2 utilizando a técnica de MLPA utilizando o kit P250 (MRC-Holland). As barras escuras representam as sondas em que foi

identificada redução do número de cópias. Sublinhado em vermelho estão marcadas as regiões de repetições idênticas de baixo número de cópias (do inglês, Long Copy Repeats, LCRs), que predispõe a região 11.2 à deleção [36]. Figura adaptada de [5].

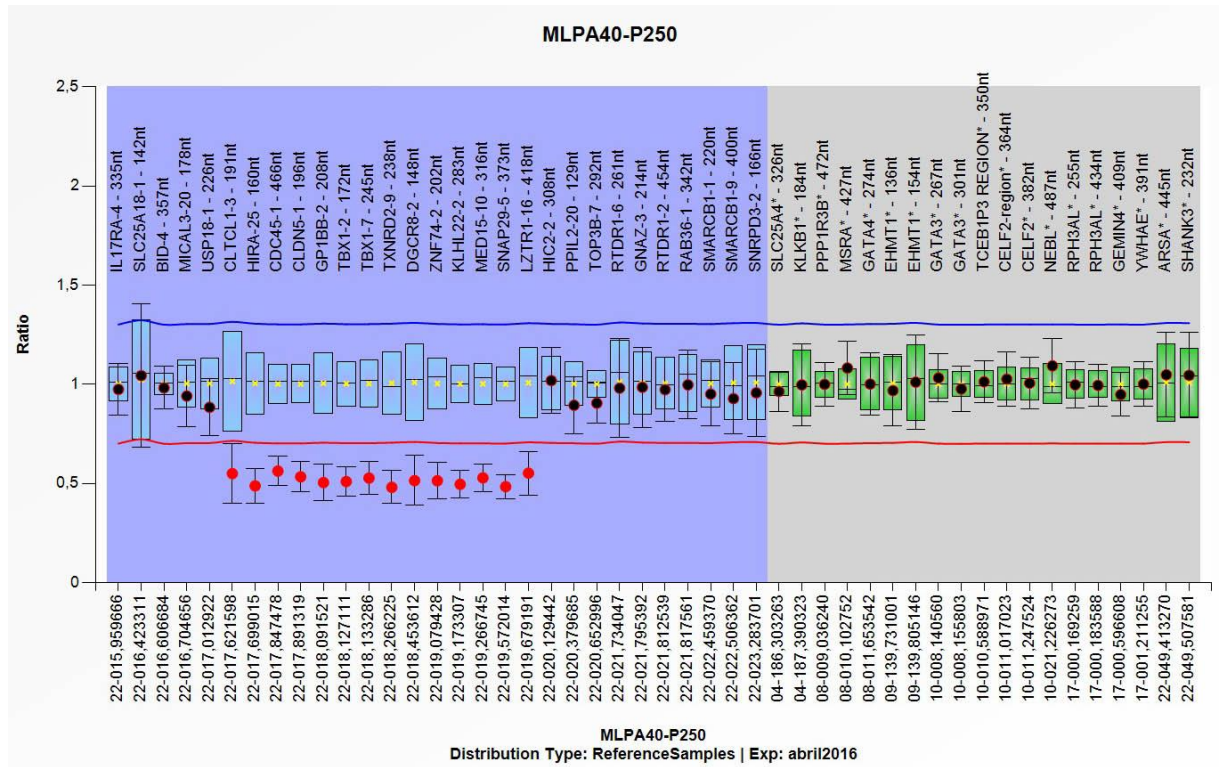


Figura 9. Deleção da região típica de 3Mb na região 22q11.2 na amostra do paciente P10. Essa mesma deleção foi encontrada nos pacientes P1, P2, P9, P10, P11, P12, P13 e P14.

Os quadros clínicos dos pacientes em que foi identificada a deleção corroboram a diversidade fenotípica característica da Síndrome da deleção 22q11.2. Constam na literatura mais de 180 achados clínicos relacionados com a síndrome, entretanto nenhuma das manifestações apresenta frequência de 100% nos casos descritos. Apesar de não haver um sinal obrigatório ou patognomônico da Síndrome, foi possível identificar nos 9 pacientes estudados as dismorfias mais frequentemente relatadas para os portadores da Síndrome da deleção 22q11.2, diversas alterações cardíacas conotrunciais, além de algumas alterações menos recorrentes. Os principais fenótipos estão resumidos na Tabela 6.

Fenótipos identificados	P1	P2	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P19*
<i>Cardiopatias congênicas</i>									
Arco aórtico à direita						+			
Coactação de aorta									+
Persistência de veia cava						+			
Persistência de canal arterioso	+	+							+
Forame oval patente			+						+
Comunicação interatrial		+						+	
Comunicação intraventricular		+	+				+		
Insuficiência de valva tricúspide		+			+				
Atresia/estenose de artéria pulmonar			+				+		
Tetralogia de Fallot				+	+			+	
Agenesia de valva pulmonar				+				+	
<i>Alterações Neuropsicomotoras</i>									
Hipotonia	+								
Microcefalia					+			+	+
Alteração da anatomia cerebral						+			

Orelhas apresentam sobredobramento de hélices	++	++		++		++
Orelhas com rotação anormal	++	++				++
<i>Alterações de tronco e membros</i>						
Tórax assimétrico	+					
Pectus excavatum						+
Alterações de coluna	+			+		
Baixa estatura				+	+	+
Prega palmar única						++
Clinodactilia de quintos dedos						++
Dedos longos	++					++
Dedos supranumerários		++				
Pé torto congênito			++			
Pele redundante em mãos e pés						++
<i>Outras alterações</i>						
Hiperextensibilidade articular						+
Hipocalcemia	+	+	+	+		+
Rins policísticos					+	+

Hidronefrose	++	+
Laringomalácia		
Perda auditiva	+	
Problemas de visão		
Hipertricose		+

Tabela 6. Resumo clínico dos pacientes portadores de deleção na região 22q11.2 estudados. Os fenótipos mais comumente associados à Síndrome da deleção 22q11.2 estão marcados em negrito. Os sinais (+) indicam a presença da característica e os sinais (++) indicam a presença da característica bilateralmente. *: paciente portadora de deleção diferente da deleção típica na região 22q11.2, diagnosticada por MLPA.

da trissomia do 21. É a microdeleção autossômica mais comum, com alta incidência de cardiopatias entre os portadores [37].

Síndrome da deleção 22q11.2 é uma designação utilizada para agrupar uma série de doenças relacionadas a deleções na região 22q11.2, e que representam um mesmo quadro, embora com expressão fenotípica altamente variável.

Após as descrições e relatos de casos diversos como os de Sedalackova (1955), DiGeorge (1968) e Shprintzen (1978), ainda restava uma indefinição de nomenclatura sendo utilizados os termos Síndrome DiGeorge e Síndrome Velocardiofacial. Somente em 1998, Bassett e colaboradores sugeriram a utilização do termo "Síndrome da deleção 22q11.2" para agrupar o conjunto de doenças descritas, sendo a designação atual [20].

A variabilidade clínica e as diferentes denominações dificultam um cálculo preciso de prevalência da Síndrome da deleção 22q11.2, que apresenta efeitos pleiotrópicos, ou seja, uma única alteração gera efeitos diversos no organismo e que resulta no acometimento de diversos sistemas, formando, portanto, um espectro fenotípico bastante amplo [35]. Estão descritos mais de 180 achados clínicos relacionados com a síndrome, entretanto nenhuma das manifestações apresenta frequência de 100% nos casos descritos. Desse modo, não existem alterações pagnomônicas para a identificação da Síndrome da deleção 22q11.2 [30].

A alteração típica da Síndrome da deleção 22q11.2 é uma deleção de cerca de 3Mb na região 11.2 do braço longo do cromossomo 22, essa alteração está presente em 87% dos pacientes portadores [35]. As estimativas em relação a outras alterações são variáveis na literatura. Em 7 a 8% dos casos, ocorre uma deleção de 1,5Mb e entre 2-3% ocorrem rearranjos menores dentro dessa mesma região da alteração padrão (Figura 11). Em menos de 5% dos pacientes foram identificadas deleções muito menores nessa região e até mutações de ponto. Também há relatos de mosaïcismo para essa deleção. A baixa frequência de mosaïcismo provavelmente se deve à subnotificação [38].

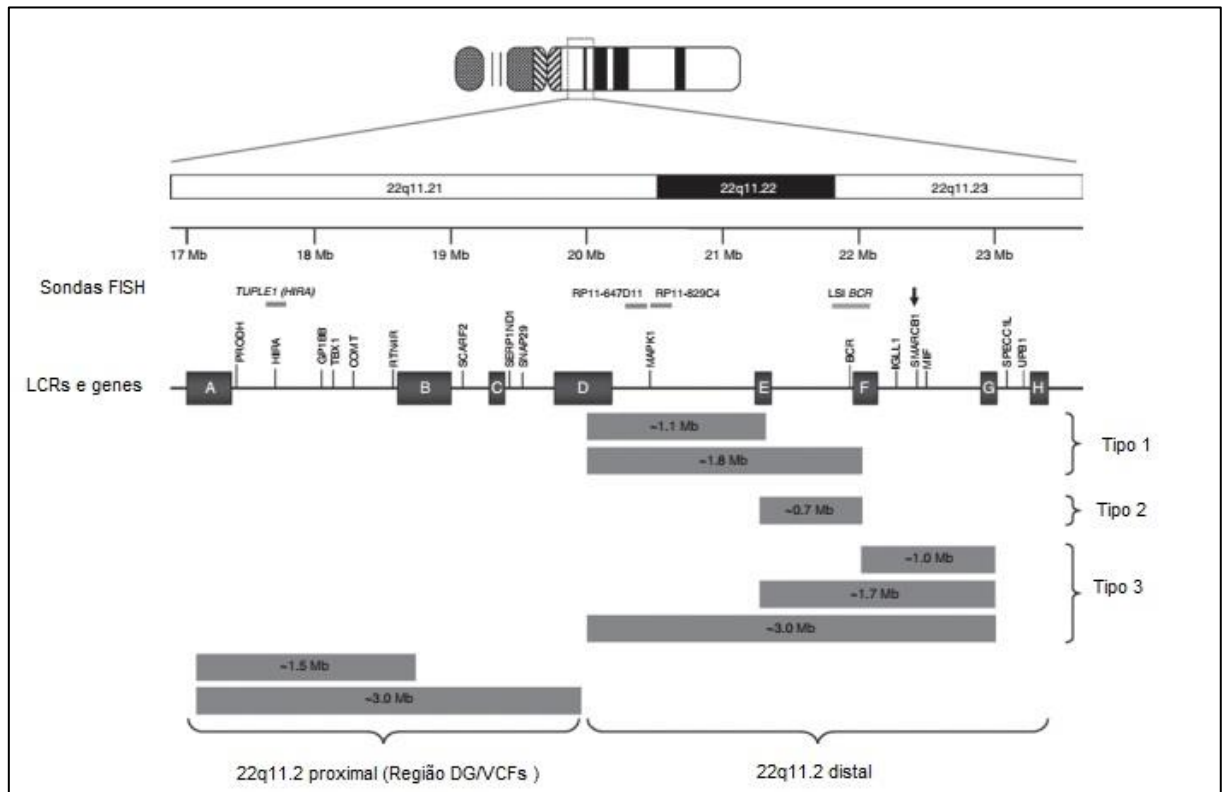


Figura 11. Representação da região 22q11.2 e as microdeleções mais recorrentes. Estão apresentadas acima as bandas citogenéticas, escala genômica, posição de sondas de hibridação de FISH mais utilizadas, identificadas por barras horizontais. As caixas de A até H ilustram o posicionamento das LCRs. Os genes estão identificados verticalmente. Embaixo, os retângulos cinzas representam a posição dos três tipos de deleção mais frequentes, classificadas em relação a posição dos LCRs. Adaptado de [38].

Estão presentes na região 22q11.2 oito sequências de repetições idênticas de baixo número de cópias (do inglês, *Long Copy Repeats*, LCRs). A presença dessas regiões repetitivas predispõe a região 11.2 à deleção em eventos de recombinação homóloga durante a prófase da meiose [39]. Os erros podem decorrer de um pareamento incorreto, em que a LCR proximal de um dos cromossomos se pareia erroneamente com a LCR distal do outro cromossomo. Como o pareamento ocorre de forma próxima ao alinhamento correto, o crossing over acontece de forma desigual, fazendo com que um dos cromossomos fique duplicado e o outro apresente deleção. Outros mecanismos envolvendo as LCRs levam a outras alterações cromossômicas, como a formação do cromossomo

supranumerário bisatélite da síndrome *Cat Eye* (CES) [39]. Os diferentes mecanismos possíveis foram apresentados na Figura 12.

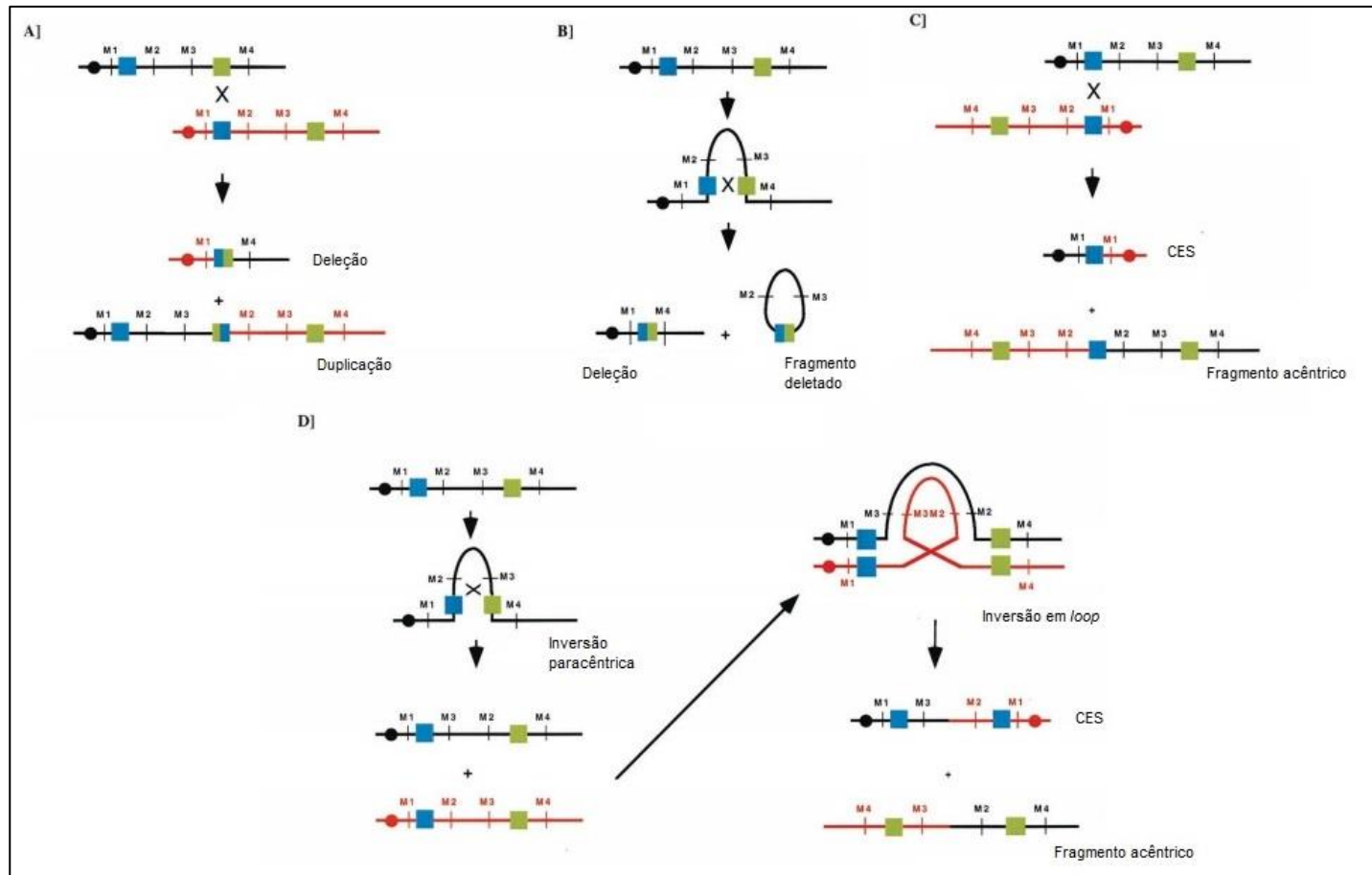


Figura 12. Modelos de rearranjos cromossômicos na região 22q11. As linhas vermelhas e pretas representam cromossomos homólogos, e os círculos pretos, centrômeros. Os LCRs são mostrados como caixas azuis e verdes. A: Recombinação entre homólogos levando a deleção e duplicação. B: Deleção intracromossômica. C: Formação de cromossomo supranumerário da síndrome Cat Eye (CES). D: Inversão paracêntrica seguida por inversão em loop levando à formação de cromossomo supernumerário da síndrome Cat Eye (CES). Adaptado de [19].

A grande variabilidade clínica dessa síndrome torna complexo o estabelecimento de relações genótipo-fenótipo. Diferentemente de outras síndromes, não é estabelecida correlação entre o tamanho da deleção e a gravidade dos fenótipos apresentados [40].

A região de 3Mb frequentemente deletada apresenta cerca de 30 genes. Os genes *UFD1L* (*Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like*), *TBX1* (*T-BOX 1*) e *TUPLE1* (*TUP Like Enhancer of Split gene -1* ou *HIRA*) são os genes mais provavelmente relacionados aos achados clínicos da síndrome. Esses genes são expressos nas células derivadas da crista neural, células essenciais no desenvolvimento do septo conotruncal, sendo as malformações na região conotruncal um achado clínico frequente em portadores da deleção 22q11.2. O gene *TBX1* aparenta ser especialmente envolvido no desenvolvimento da síndrome, tendo sido encontradas mutações nesse gene em pacientes sindrômicos que não apresentavam a deleção 22q11.2 [41].

A deleção da região 22q11.2 apresenta padrão de herança autossômico dominante nas famílias. Portadores da deleção, independente do sexo, apresentam risco de 50% de transmiti-la aos seus descendentes. Durante a investigação genética é indicado o teste em ambos os pais do portador, uma vez que a ampla variabilidade fenotípica da síndrome admite que um genitor portador da deleção não tenha as características fenotípicas da síndrome .

4.4 PACIENTES INVESTIGADOS POR ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA).

A análise cromossômica por microarray foi realizada em 10 pacientes nos quais não foram identificadas alterações patogênicas nos exames de cariótipo e de análise por MLPA. Em cinco pacientes foram encontradas CNVs benignas ou não causais, encontradas em indivíduos normais que servem de controle do banco de dados DGV.

4.4.1 Pacientes com alterações benignas.

P6

Esse paciente apresenta alteração de cariótipo que consiste em um cromossomo marcador não identificado, 47, XY, +mar[17]/46, XY[13]. Suas características clínicas foram apresentadas no item 4.1 dos resultados.

P7

Possui resultado do exame investigação de X-frágil negativo. O cariótipo apresentou resultado normal, 46, XY[20].

A análise por microarrays identificou a presença de polimorfismos normais na população brasileira (Dup14q32.33 e Del14q21.2); deleções de menos de 100Kp em regiões pobres em genes (1p34.1, 3p21.31,5q35.3, Xq26.3). Além disso foi identificada perda de heterozigosidade na região 19q13.2q13.31(39,050,478-44,362,753) hmz, de 5,3 Mb, envolvendo 166 genes. Não foram identificados genes-candidatos para explicar o quadro do paciente nessa região alterada. Todas essas alterações foram consideradas benignas, e o resultado da análise por microarray para o paciente P7 é normal.

P8

O exame de cariótipo apresentou resultado normal, 46,XX [30]. O exame de MLPA apresentou resultado normal. A análise por microarray identificou alterações de número de cópias nos cromossomos 1, 5, 8, 11, 14, 16 e X. Essas alterações, entretanto eram pequenas (a maior com 912Kb), envolviam poucos genes, e eram recorrentes em indivíduos-controle do banco de dados DGV. Essas alterações são consideradas polimorfismos, e o resultado da análise foi normal.

Em estudo posterior a equipe de genética do HUB analisou as ocorrências de *situs inversus partialis* e levantou a hipótese de Síndrome de Kartagener ou Discinesia ciliar primária, que envolve defeitos de lateralidade e de CC, além de sinusite crônica, bronquites, otites e outras afecções respiratórias e otológicas. Diante dessa suspeita foi solicitada tomografia de seios paranasais que identificou sinusopatia maxilar bilateral, um dos achados característico da síndrome investigada. A Síndrome de Kartagener ou Discinesia ciliar primária é uma desordem de motilidade ciliar que causa diversas doenças otológicas, sinusais e pulmonares, alterações de lateralidade dos órgãos e infertilidade masculina. A síndrome tem sido geneticamente caracterizada como uma alteração recessiva decorrente de mutações em diversos genes .

O diagnóstico clínico é de Síndrome de Kartagener, sendo indicada a pesquisa de mutação nos genes descritos para caracterização da patologia e aconselhamento.

P16

O exame de cariótipo apresentou resultado normal, 46, XX[30]. A análise por MLPA também apresentou resultado normal.

A análise por microarray identificou uma deleção polimórfica na região 14q11.2 de 248 Kb que não envolve nenhum gene, uma deleção na região 2q14.3 de 188 Kb que não envolve nenhum gene, e uma deleção em 19p12 de 123Kb que envolve um único gene não codificante, *ZNF826P*. A análise não identificou nenhuma alteração com potencial patogênico apresentando, portanto, resultado normal. Sugere-se a continuidade dos estudos desse caso a partir de técnicas de diagnóstico molecular que possibilitem a identificação de mutações.

P17

O exame de cariótipo apresentou resultado normal, 46, XX[30]. A análise por MLPA também apresentou resultado normal.

A análise por microarray identificou pequenos CNVs (468-71 Kb) que envolviam poucos genes, nenhum deles associadas a cardiopatias congênitas ou DI. Todas essas alterações foram consideradas benignas, e o resultado da análise por microarray para a paciente P17 é normal.

4.4.2 Pacientes com alterações patogênicas

P3

Os exames de cariótipo e MLPA apresentaram resultado normal.

A análise por microarray identificou uma deleção de 1,3 Mb na região 3q26.32: arr [hg19] 3q26.32 (176,025,379-177,377,006) (Figura 13). Essa deleção envolve um gene codificante, *TBLX1R1*, e parte de um gene não codificante, *LINC00578*.

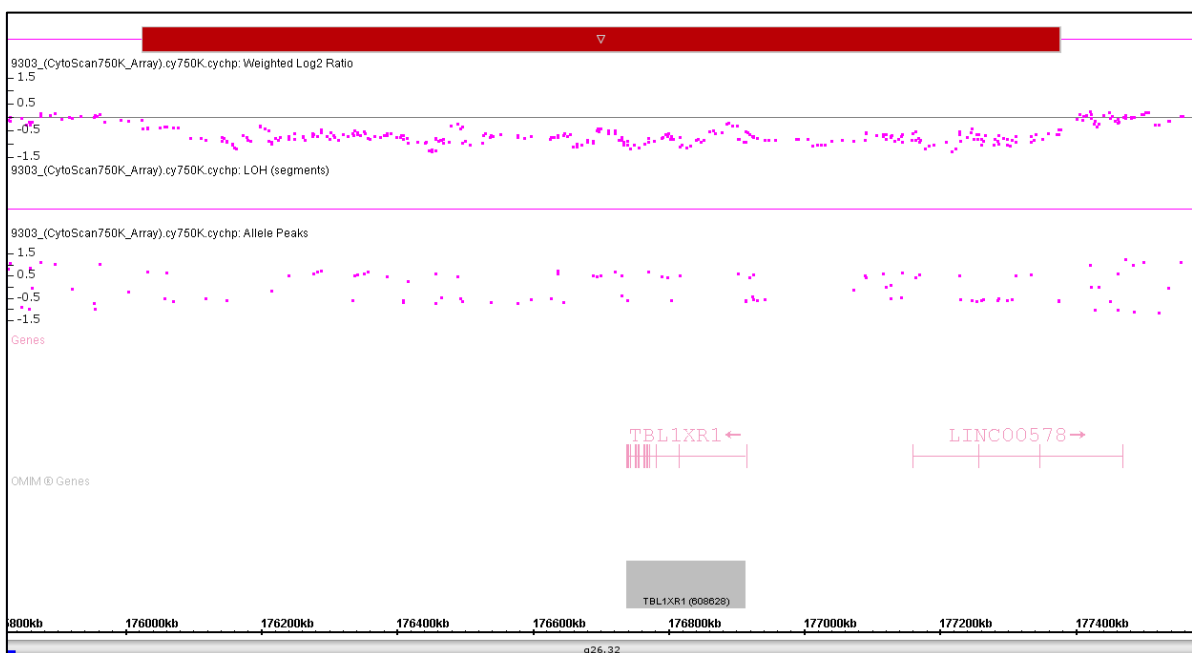


Figura 13. Deleção de 1,3 Mb na região 3q26.32: arr [hg19] 3q26.32 (176,025,379-177,377,006) identificada na paciente P3, envolvendo o gene *TBLX1R1*, e parte de um gene não codificante, *LINC00578*.

O gene *TBLX1R1* (*transducin beta-like 1 X-linked receptor 1*-NM_024665-OMIM 608628), também chamado *TBLR1* e *IRA1*, codifica uma proteína nuclear de 515 aminoácidos que contém sete domínios WD40 e um domínio LisH que mediam a di- e tetramerização. A proteína TBL1XR1 é encontrada na maioria dos tecidos e desempenha um papel importante na via de sinalização Wnt, que influencia diversos processos biológicos como polaridade, proliferação e migração celular; desenvolvimento craniofacial e neurológico; cardiogênese, tumorigênese e metástase; e diferenciação e renovação de células-tronco .

Estão descritos na plataforma DECIPHER apenas 6 casos com deleção nessa região, apresentando tamanhos diferentes, mas com semelhanças fenotípicas importantes presentes também na paciente P3, como DI moderada, ADNPM, atraso importante de linguagem, anomalias dentárias, queixo pontudo, baixa implantação de orelhas, dedos alongados, clinodactilia de quintos dedos bilateral. A paciente P3 é entretanto, a primeira descrita com malformações cardíacas.

O papel do gene *TBL1XR1* na via de sinalização Wnt e a atuação dessa via tanto no desenvolvimento cerebral quanto cardíaco estão de acordo com os fenótipos identificados nos pacientes descritos na literatura e na paciente P4 e faz do gene *TBL1XR1* um bom candidato para explicar a ocorrência conjunta de DI e cardiopatias.

P4

Os exames de cariótipo e MLPA do paciente apresentaram resultados normais. A análise por microarrays identificou duplicação na região 8p11.1q11.1. Essa duplicação envolve um único gene, *POTEA* (pote ankyrin domain family, member a; *POTEA*-OMIM 608915). Esse gene tem 31Kb, é composto de 14 exons e expresso na próstata, ovários, testículos e placenta. Faz parte de uma família de dez genes parálogos que se encontram dispersos em diferentes cromossomos (2, 8, 13,

14, 15, 18, 21, e 22). Essa família gênica é bastante estudada por sua relação com o câncer de próstata, sendo um gene alvo para imunoterapia desse tipo de neoplasia. No cromossomo 8 esse gene está presente na região 8p11.1 e na região 8q11.1, e por isso a duplicação parece incluir o centrômero apesar do microarray utilizado não dispor de sondas que identifiquem a região centromérica (Figura 14).

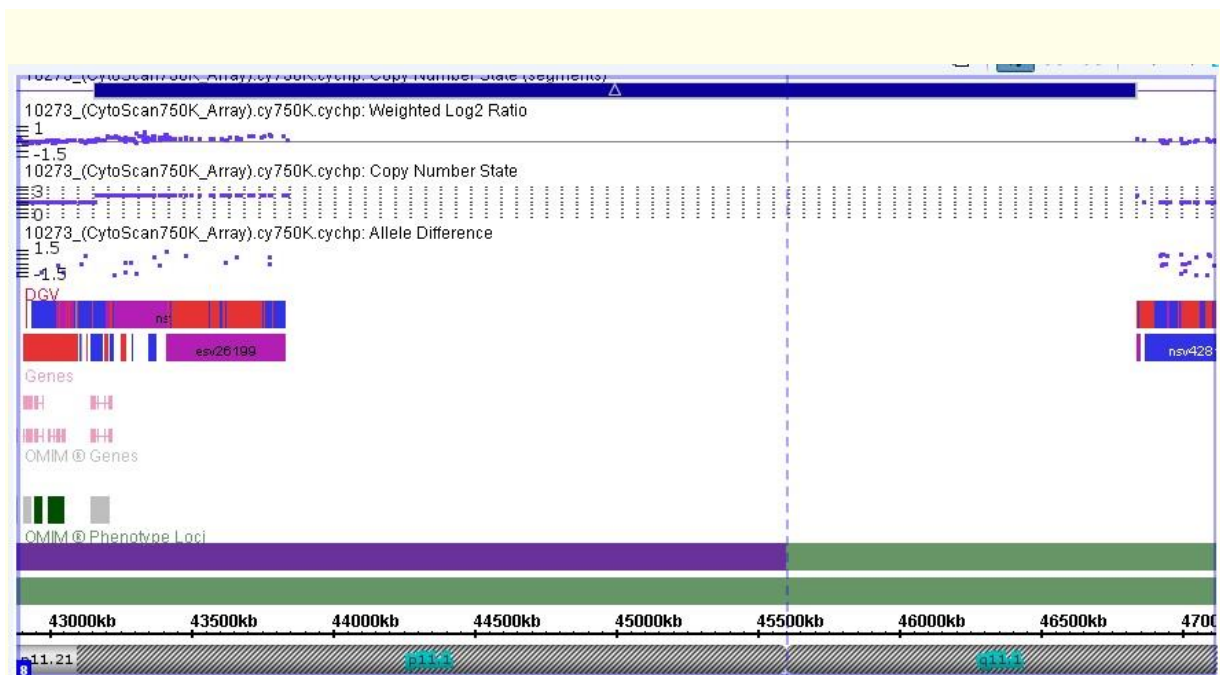


Figura 14. Duplicação arr[hg19] 8p11.1q11.1(43,161,631-46,839,736)x3, visualizada com 3,6Mb identificada no paciente P4. A linha vertical tracejada marca posição do centrômero.

Essa duplicação não está descrita no banco de dados DGV. Investigando as variantes patogênicas no DECIPHER estão descritos dois pacientes portadores de defeitos de septação (254177-ASD e 296426-VSD) com duplicação envolvendo o gene *POTEA*. Porém as duplicações descritas são muito maiores e envolvem um maior número de genes. Outro paciente (303006) descrito no DECIPHER apresenta deleção menor, envolvendo apenas quatro genes e entre eles o gene *POTEA*. Esse paciente apresenta fenótipo de comprometimento cognitivo e rim em ferradura. Apesar de não haver referências bibliográficas que correlacionem a duplicação encontrada com o fenótipo do paciente P4, devido ao tamanho e a não ocorrência dessa variação em pacientes de fenótipo normal, esse CNV é classificado como patogênico.

Como a duplicação identificada envolve a região centromérica para as quais não há cobertura de sondas na técnica de CMA é provável que a duplicação real apresente um tamanho menor do que o ilustrado na Figura 15.

Outra hipótese interessante para a alteração identificada seria investigar se a duplicação apresentada pode na verdade ser resultado de uma inversão pericêntrica. Em ambos os casos é necessário sequenciar a região de interesse para elucidar melhor as alterações encontradas.

P5

Os exames de cariótipo e MLPA apresentaram resultado normal. A investigação por microarray identificou duplicação na região 6p25.3p25.1: arr[hg19] 6p25.3p25.1(156,974-5,608,374)x3, com 5,45 Mb, envolvendo 40 genes, 23 desses referenciados no OMIN (Figura 15).

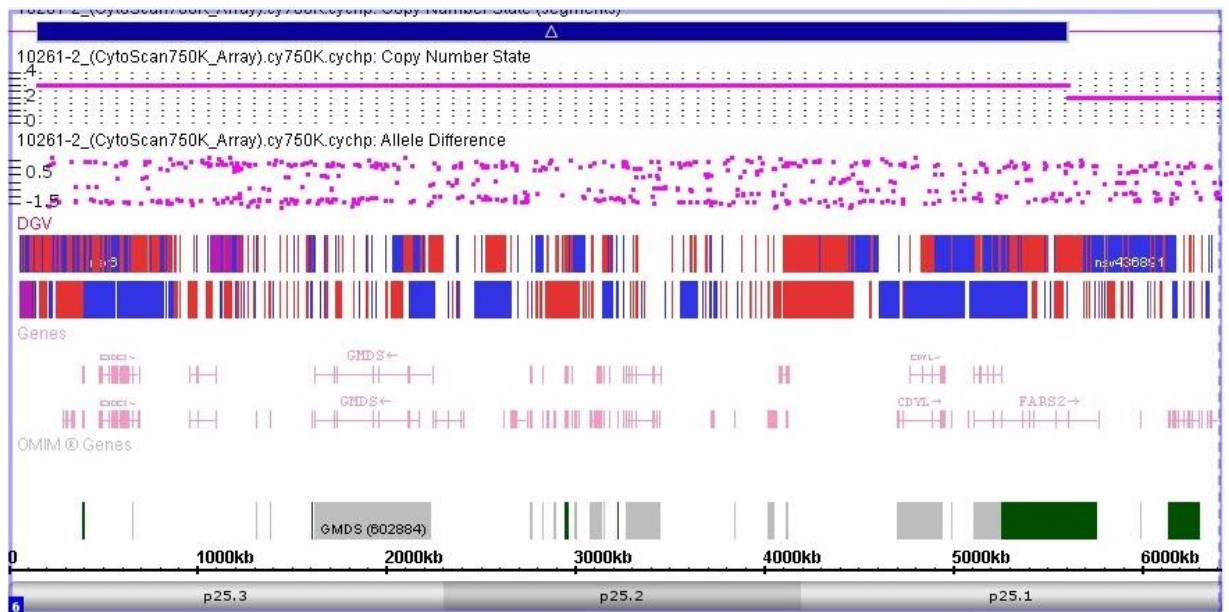


Figura 15. Duplicação na região 6p25.3p25.1: arr[hg19] 6p25.3p25.1(156,974-5,608,374)x3, com 5,45 Mb, identificada no paciente P5. Ressalta-se a riqueza gênica da região subtelomérica duplicada.

Na região duplicada estão localizados 40 genes, entre eles 4 genes (*FOXC1*, *SERPINB6*, *TUBB2A* e *TUBB2B*) estão envolvidos em transtornos do

desenvolvimento, tendo sido correlacionados com diferentes fenótipos de acordo com o banco de dados DDG2P (do inglês, *Developmental Disorders Genotype-Phenotype Database*).

O gene *FOXC1* (*FORKHEAD BOX C1*, OMIM-601090) faz parte da grande família de fatores de transcrição do tipo Forkhead, com funções já descritas em diversos eventos embriológicos. *FOXC1* tem papel essencial no desenvolvimento cardíaco, especialmente na formação das vias de saída do coração. Os genes *FOXC1* e *FOXC2* são expressos em diferentes tecidos embriológicos, nas células derivadas do campo cardíaco secundário, nas derivadas do pró-epicárdio e nas células endoteliais e mesenquimais do coração e dos vasos cardíacos em desenvolvimento. São expressos também nas células derivadas da crista neural, responsáveis pela formação dos coxins endocárdicos durante os processos de septação cardíaca. Estudos experimentais com ratos identificaram que a alteração da dosagem dos genes *FOXC1* e *FOXC2* levam a defeitos cardíacos nas vias de saída do coração, como interrupção ou coactação do arco aórtico, defeitos de septação ventricular, hipoplasia de valvas e alteram ainda a espessura do miocárdio.

Devido ao tamanho da alteração, ao número de genes afetados e a presença de genes relacionados ao fenótipo do paciente, a duplicação identificada na região 6p25.3p25.1: arr[hg19] 6p25.3p25.1(156,974-5,608,374)x3 é considerada um CNV patogênico.

Levando em conta o funcionamento cooperativo e dose-dependente dos genes *FOXC* no desenvolvimento cardiovascular, o gene *FOXC1* representa um gene-candidato para explicar as alterações cardiológicas apresentadas pelo paciente P5.

O paciente P5 apresenta ainda uma deleção na região 20q13.33 arr[hg19] 20q13.33(61,541,210-62,913,645)x1, de 1,37Mb, contendo 59 genes (Figura 16).

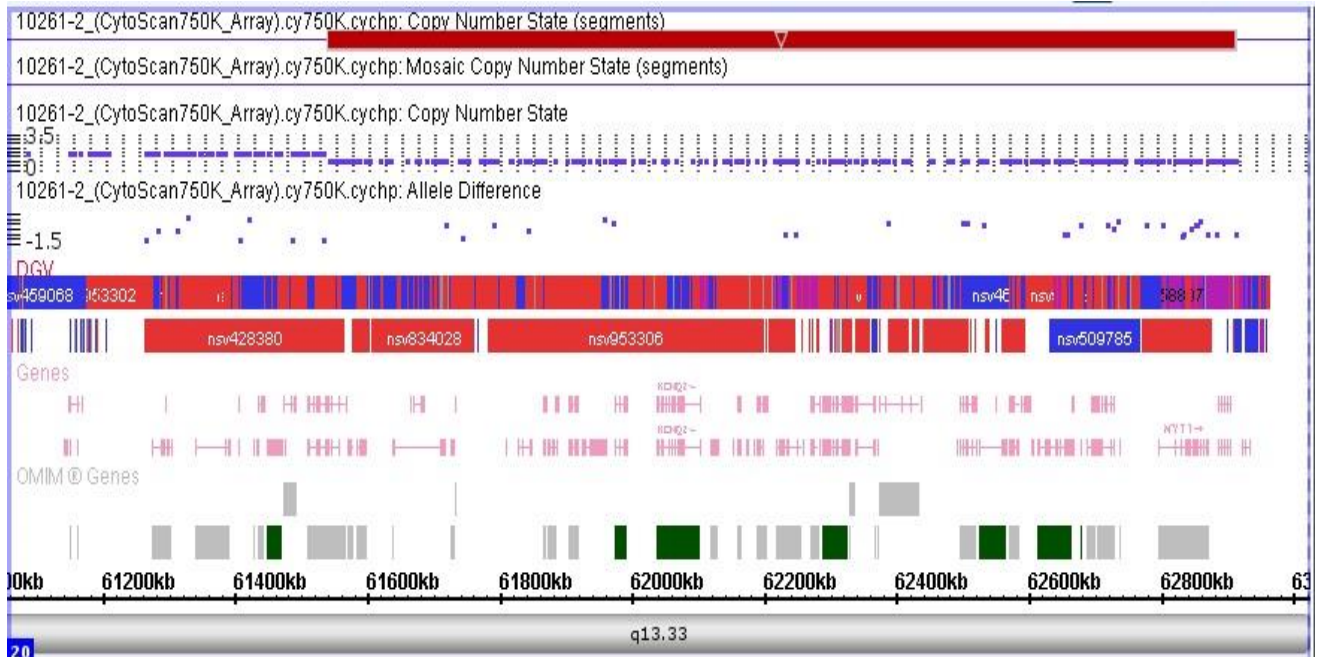


Figura 16. Deleção na região 20q13.33 arr[hg19] 20q13.33(61,541,210-62,913,645)x1, de 1,37Mb, contendo 59 genes identificada no paciente P5.

Entre os genes deletados, cinco estão envolvidos em transtornos do desenvolvimento e relacionados no DDG2P: os genes *CHRNA4*, *COL9A3*, *EEF1A2*, *KCNQ2* e *RTEL1*.

O gene *KCNQ2* (*Potassium Channel, Voltage-Gated, Kqt-Like Subfamily, Member 2*; OMIM-602235) expressa uma proteína dos canais de potássio voltagem-dependentes, que é expressa no tecido cerebral. O gene *CHRNA4* (*Cholinergic Receptor, Neuronal Nicotinic, Alpha Polypeptide 4*; OMIM-118504) expressa uma proteína de canais iônicos que mediam a transdução de sinal nas sinapses, também expressa no cérebro. O gene *EEF1A2* (*Eukaryotic Translation Elongation Factor 1, Alpha-2*; OMIM-602959) que codifica uma proteína participante do transporte de RNA transportador para o sítio de transcrição dos ribossomos, sendo expressa em diversos tecidos

Esses três genes estão descritos para fenótipos familiares de epilepsia, de corrente de mutações em *KCNQ2*, *CHRNA4* e *EEF1A2*, mesmo fenótipo descrito para famílias que apresentam deleção envolvendo *KCNQ2*. Esses genes podem estar, portanto, relacionados aos episódios epiléticos descritos para o paciente P5.

Devido ao tamanho e ao conteúdo gênico a deleção na região 20q13.33 é considerada um CNV patogênico.

A ocorrência concomitante de uma duplicação no cromossomo 6 e de deleção no cromossomo 20 identificados na análise por CMA pode indicar a ocorrência de uma translocação entre os dois cromossomos. Devido ao tamanho e a posição cromossômica em que ocorreram pode não ter sido possível observar a alteração na análise do cariótipo. Uma análise posterior por sequenciamento pode confirmar a suspeita de translocação.

4.4.3 Pacientes com alterações potencialmente patogênicas

P20

O exame de cariótipo apresentou resultado normal, 46, XY[20]. A análise por MLPA também apresentou resultado normal.

A análise por microarray identificou polimorfismos pequenos (17-443 Kb). Chama a atenção deleção em 3q22.3 arr[hg19] 3q22.3(138,353,082-138,443,213)x1, de 90Kb, envolvendo apenas o gene *PIK3CB*. Essa alteração não está descrita como benigna no banco de dados DGV (Figura 17).

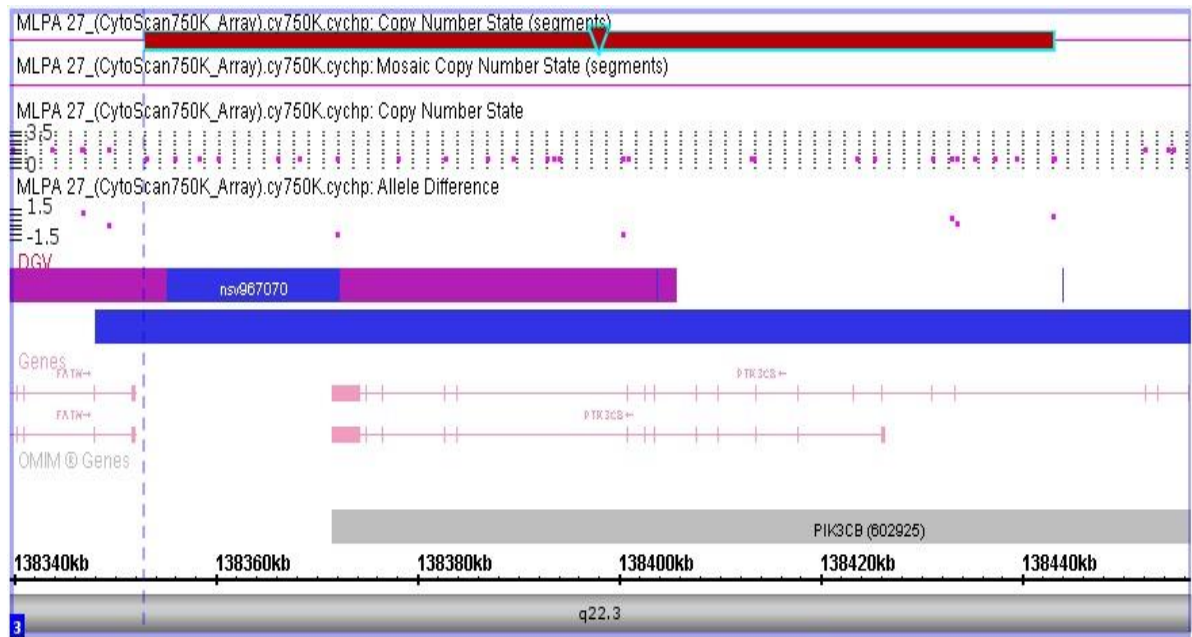


Figura 17. Deleção identificada no paciente P20 na região 3q22.3 arr[hg19] 3q22.3(138,353,082-138,443,213)x1, de 90Kb, envolvendo o gene *PIK3CB*.

O gene *PIK3CB* (*Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic, Beta*; OMIM 602925) está descrito como um dos genes candidatos a explicar casos de cardiopatia isolada, tendo sido implicada em casos de dupla via de saída do ventrículo direito, retorno venoso pulmonar anômalo total e defeito de septação atrioventricular. Os genes da família *PI3K* são quinases lipídicas evolutivamente bem conservadas, que atuam nas respostas fisiológicas a estímulos. Genes dessa família são expressos em cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais e de músculo liso cardíaco, e através da sinalização conjunta com a proteína PTEN modulam mecanismos de sobrevivência celular, hipertrofia, contratividade, metabolismo e mecanotransdução.

Devido às implicações do gene deletado nas vias de sinalização cardíacas, não ocorrência desse CNV em indivíduos-controle e a descrição de outros casos de cardiopatia envolvendo CNVs nessa região, variação no número de cópias será caracterizada como possivelmente patogênica.

4.4.4 Pacientes com alterações VOUS

P15

O exame de cariótipo apresentou resultado normal, 46, XX[50]. A análise por MLPA também apresentou resultado normal.

A análise por microarray identificou 13 alterações no número de cópias, em sua maioria polimorfismos conhecidos ou alterações em regiões não-gênicas. Foi identificada uma duplicação na região 19p13.3 de 201,4 Kb, contendo apenas 5 genes: *MBD3*, *UQCR11*, *TCF3*, *ONECUT3* e *ATP8B3* (Figura 18).

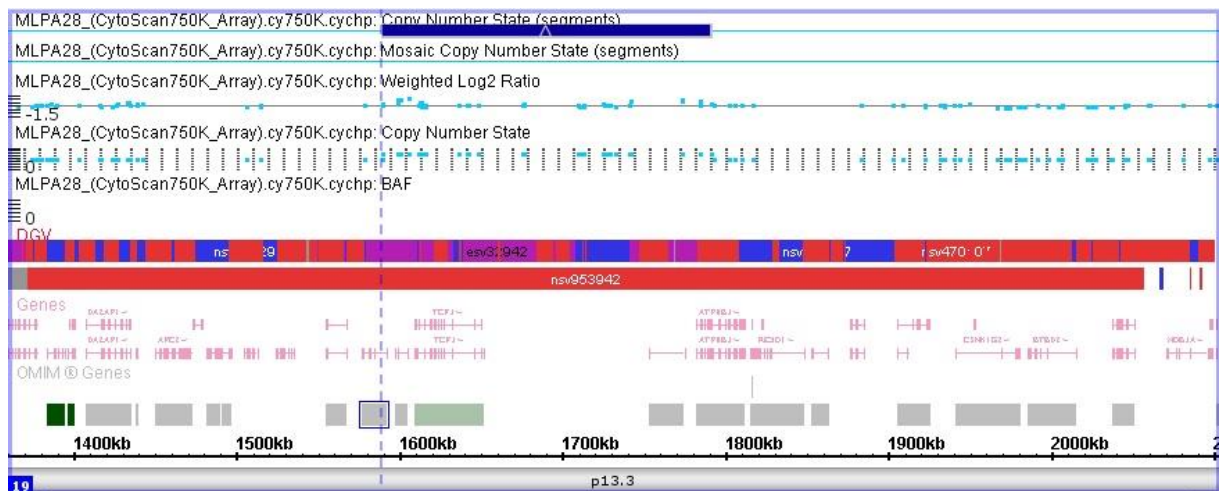


Figura 18. CNV (arr[hg19] 19p13.3(1,589,635-1,791,086)x3) classificada como VOUS identificada no paciente P15. Nota-se ainda a não ocorrência dessa alteração em pacientes do banco de dados DGV.

Alterações cromossômicas patogênicas estão descritas para essa região em pacientes com cardiopatia isolada, mas os genes presentes na duplicação identificada no paciente não estão associados a malformações cardíacas. O gene *MBD3* já foi anteriormente proposto como gene candidato para alterações neuro-comportamentais, por fazer parte da família de genes *MDB*, anteriormente associada a desordens neurológicas. Entretanto essa associação foi proposta para uma microdeleção na região 19p13.3, em que não foram descritas malformações cardiológicas associadas.

Embora existam suspeitas sobre a patogenicidade de CNVs identificados nessa região, a correlação genótipo-fenótipo não foi estabelecida, especialmente em microduplicações como é o caso da paciente. Essa alteração é classificada então como VOUS.

4.5 O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS RARAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.

O diagnóstico genético no Sistema Único de Saúde (SUS) ganhou novas dimensões a partir da publicação da Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014, que institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, e prevê a realização no SUS de diversos procedimentos diagnósticos, inclusive os utilizados nesse estudo. A política instituída é essencial para ampliar o acesso da população brasileira a esse tipo de diagnóstico, resgatando os princípios que regem o SUS: universalidade, equidade e integralidade da atenção à saúde da população. Além disso, assegura o pleno cumprimento do Artigo 226º, § 7º da Constituição Federal brasileira, que diz ser de competência do Estado propiciar recursos educacionais e científicos para o exercício do direito ao adequado planejamento familiar (Constituição da República Federativa do Brasil de 1988).

A ampliação das possibilidades de diagnóstico genético no SUS trazida pela Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras ainda não atingiu seu potencial modificador uma vez que carece de mecanismos que viabilizem sua implementação com maior agilidade, dando condições para a habilitação e implementação dos centros de referência e dos centros especializados em doenças raras, conforme previsto na legislação.

A urgência na implantação dessa lei trás benefícios diretos não só à população mas também ao próprio SUS, uma vez que além de propiciar o diagnóstico, acompanhamento e tratamento com maior qualidade para os pacientes o diagnóstico genético tem se apresentado como uma importante ferramenta na redução de custos em saúde.

Levando em conta as enfermidades abordadas nesse estudo, a detecção precoce das cardiopatias tem impacto significativo nos custos de tratamento. Estima-se que a detecção tardia das cardiopatias congênicas leve à 52% mais admissões hospitalares, 18% mais dias de hospitalização e aumento global de 35% no custo por paciente .

Em relação às DIs, estudos mais pontuais compararam o custo do diagnóstico tradicional e do diagnóstico genético das DIs, utilizando o sequenciamento completo do genoma (WES, do inglês *whole-exome sequencing*). Estimou-se que o custo do diagnóstico tradicional é de 16,409 dólares por paciente, e quando utilizado o diagnóstico genético, esse custo cai para 3,972 dólares, tendo a vantagem de avaliar e levar ao aconselhamento genético não só do paciente, mas também dos genitores. Essa redução de custo se deve à significativa redução do número de procedimentos, admissões hospitalares e dias de hospitalização quando utilizado o diagnóstico genético .

Mesmo a partir da utilização das técnicas de estudo genômico mais complexas e caras do que as utilizadas nesse estudo, a capacidade de diagnóstico e a redução no custo ressaltam a importância da implantação de técnicas de diagnóstico genético também quando avaliadas do ponto de vista econômico.

A redução dos custos de diagnóstico e os benefícios no manejo dos pacientes ressaltam a importância do diagnóstico genético na identificação precoce das CC e das DIs.

A implementação de técnicas modernas de diagnóstico genético no SUS garante ainda o cumprimento do artigo 196 da Constituição Federal brasileira, que preconiza a saúde como um direito de todos e um dever do Estado. Esse direito tem sido evocado com maior frequência nos últimos anos, criando uma onda crescente de judicialização de procedimentos médicos. A obrigação de disponibilizar pelo SUS, exames diagnóstico ou leitos de UTI, por exemplo, para pacientes que não tenham acesso é imposta pelo Poder Judiciário em casos judiciais, e deve ser cumprida em caráter de urgência, tornando os procedimentos ainda mais caros para o Estado .

A complexidade do panorama de doenças raras requer esforço multiprofissional, envolvendo não só o Estado mas também centros de pesquisa, profissionais, associações de familiares/pacientes e a indústria farmacêutica . Os benefícios dessa ação conjunta envolvem o desenvolvimento da pesquisa científica no país, disponibilidade de qualificação para profissionais

em saúde, aparelhamento e redução de custos para o SUS e, mais importante, o acesso do paciente a procedimentos diagnósticos e de promoção da saúde.

5. CONCLUSÕES

- Esse estudo confirma a eficiência da identificação de alterações cromossômicas para o diagnóstico genético de pacientes que apresentam cardiopatias congênitas e DI pelas técnicas utilizadas nesse estudo.
- A taxa de diagnósticos alcançados nesse estudo (75%) comprovou a eficiência e a aplicabilidade do fluxograma proposto para a identificação das causas genéticas de cardiopatias congênitas e de DI.
- Do total de pacientes analisados, 70% apresentaram alterações cromossômicas submicroscópicas que não teriam sido diagnosticados por cariótipo convencional.
- O estudo apresentado ressalta a importância da diversificação das técnicas de diagnóstico genético para maximização da capacidade diagnóstica, especialmente a partir da inclusão de técnicas de citogenética molecular.
- O diagnóstico de 45% dos pacientes avaliados a partir da análise por MLPA confirma a eficiência dessa técnica na identificação de alterações cromossômicas quando associada a uma indicação clínica bem fundamentada.
- A identificação de 9 dos 20 pacientes como portadores da Síndrome de deleção 22q11.2 ressalta a importância da triagem dessa alteração submicroscópica em pacientes portadores de cardiopatias e DI.
- A ocorrência de quatro pacientes que não apresentaram alterações identificáveis nos exames propostos indica que o fluxograma de diagnóstico proposto pode

ser melhorado a partir da ampliação que inclua técnicas de detecção de mutações.

- Os genes *TBLX1R1* e *FOXC1* foram sugeridos como genes-candidatos para explicar a associação entre deficiências intelectuais e cardiopatias congênitas, sendo necessários estudos posteriores para investigar a atuação desses genes nas patogenias estudadas.
- O gene *POTEA* foi sugerido como gene-candidato para ocorrência de CC isolada e os genes *KCNQ2*, *CHRNA4* e *EEF1A2*, podem estar relacionados à DI associada à epilepsia. Estudos posteriores podem elucidar a importância desses genes em cada patologia.
- A diversidade de fenótipos encontrados e os dados coletados nesse estudo indicam uma diversidade de regiões genômicas associadas a ocorrência de CCs. Estudos futuros poderão elucidar melhor a recorrência das alterações identificadas nesse estudo e na literatura também em casos de cardiopatias congênitas isoladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jones KL, Jones MC, Del Campo M. Smith's recognizable patterns of human malformation [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2010 [cited 2010].
2. Richards A, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev* [Internet]. Bentham Science Publishers; 2007 [cited 2007];6:91–7.
3. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2009];43:838–46.
4. Stevenson RE, Hall JG, Goodman RM. Human malformations and related anomalies [Internet]. Vol. 1. Oxford Univ Pr; 1991 [cited 1991].
5. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics [Internet]. Churchill Livingstone Elsevier; 2005 [cited 2005].
6. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease the glass half empty. *Circ Res* [Internet]. Am Heart Assoc; 2012;112:707–20.
7. Bajolle F, Zaffran S, Bonnet D. Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. Elsevier; 2008;102:59–63.
8. Epstein JA. Cardiac development and implications for heart disease. *New Engl J Med* [Internet]. Mass Medical Soc; 1992 [cited 1992];363:1638–47.
9. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's human embryology [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2010 [cited 2010].
10. Sadler TW. Langman's medical embryology [Internet]. Lippincott Williams & Wilkins; 2009 [cited 2009].
11. Laugwitz K-L, Moretti A, Caron L, Nakano A, Chien KR. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* [Internet]. The Company of Biologists Ltd; 2006 [cited 2006];135:193–205.
12. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, Poelmann RE. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 2003 [cited 2003];57:169–76.

13. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2007];11:139–46.
14. Sasaki RK. Atualizações semânticas na inclusão de pessoas: Deficiência mental ou intelectual? Doença ou transtorno mental. *Rev Nac de Reabil* [Internet]. 2003 [cited 2003];43:9–10.
15. Katz G, Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud pública de México* [Internet]. SciELO Public Health; 2007;50:s132–41.
16. Siew W-H, Tan K-L, Babaei MA, Cheah P-S, Ling K-H. MicroRNAs and intellectual disability (ID) in Down syndrome, X-linked ID, and Fragile X syndrome. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2011 [cited 2011];7.
17. Mancini MC, Teixeira S, Araújo LG, Paixão ML, Magalhães LC, Coelho ZAC, et al. Estudo do desenvolvimento da função motora aos 8 e 12 meses de idade em crianças nascidas pré-termo e a termo. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. SciELO Brasil; 2001;60:974–80.
18. Moeschler J. Neurodevelopmental Disabilities: Global Developmental Delay, Intellectual Disability, and Autism. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2010].
19. Belangero SIN, Bellucco FT, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach M, Melaragno MI. Deleção 22q11. 2 em pacientes com defeito cardíaco conotruncal e fenótipo da síndrome da deleção 22q11. 2. *Arq bras cardiol* [Internet]. 2007 [cited 2007];92:307–11.
20. Strachan T, Read A. *Genética molecular humana* [Internet]. Artmed; 2012.
21. Shaffer LG, McGowan J. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. 2013;
22. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* [Internet]. *Eur Soc Cardiology*; 2005 [cited 2005];28:2778–84.
23. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al.

- Global variation in copy number in the human genome. *nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2004];444:444–54.
24. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not?: Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* [Internet]. Wiley Online Library; 2011 [cited 2011];84:415–21.
25. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* [Internet]. Elsevier; 2009;86:749–64.
26. Srebniak MI, Diderich KE, Govaerts LC, Joosten M, Riedijk S, Galjaard R-J, et al. Types of array findings detectable in cytogenetic diagnosis: a proposal for a generic classification. *Eur J Hum Genet EJHG* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2012];22:856–8.
27. 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* [Internet]. Oxford Univ Press; 2001;30:e57–e57.
28. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 2007;64:358–63.
29. Patterson MC, Zoghbi HY. Mental retardation X marks the spot. *Neurology* [Internet]. AAN Enterprises; 2002;61:156–7.
30. Molck MC, Vieira TP, Sgardoli IC, Simioni M, dos Santos AP, Souza J, et al. Atypical copy number abnormalities in 22q11. 2 region: Report of three cases. *Eur J Med Genet* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2011];56:515–20.
31. Boggula VR, A Shukla SD. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. *Indian J Med Res*. 2014 Jan;139(1):66-75.
32. Gardner RJMK, GR Sutherland LS. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 2011;
33. Wang JC, Boyar FZ. Chromosomal microarray analysis as the first-tier test

for the identification of pathogenic copy number variants in chromosome 9 pericentric regions and its challenge, 2016; *Mol Cytogenet.* 2016; 9: 64.

Published online 2016 Aug 10. Doi: 10.1186/s13039-016-0272-6.

34. Xiong WY, Jiang ZY, Zou CC. Case Report Tetrasomy X in a Child with Multiple Abnormalities: Case Report and Literature Review from China. *HK J Paediatr [Internet]*. 2013;19:37–40.

35. Rosa RFM, Zen PRG, Roman T, Graziadio C, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11. 2: compreendendo o CATCH22. *Rev Paul Pediatr [Internet]*. 2007 [cited 2007];27:211–20.

36. Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet [Internet]*. BioMed Central; 2011 [cited 2011].

37. Rosa RFM, Zen PRG, Graziadio C, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11. 2 e cardiopatias congênitas. *Rev Paul Pediatr [Internet]*. 2009 [cited 2009];29:251–60.

38. Mikhail FM, Burnside RD, Rush B, Ibrahim J, Godshalk R, Rutledge SL, et al. The recurrent distal 22q11. 2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. *Genet Med [Internet]*. Nature Publishing Group; 2011 [cited 2011];16:92–100.

39. Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med [Internet]*. Nature Publishing Group; 1999 [cited 1999];3:6–13.

40. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11. 2 deletion syndromes. *Lancet [Internet]*. Elsevier; 2005 [cited 2005];370:1443–52.

ANEXO A-Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UnB



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 081/2009.

Título: "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

Pesquisador Responsável: Iris Ferrari.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 13/10/2009.

Proposição do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 28/10/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/11/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

APÊNDICE A - Termo de Consentimento (TCLE)

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8ml de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, _____, profissão _____, residente e domiciliado em _____, portador da Cédula de Identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____, nascido(a) em __/__/____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade com a participação de meu (minha) filho(a) _____ no estudo “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico”, e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- () Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- () Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- () Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Dra. Íris Ferrari Pesquisadora responsável
Telefone para contato: (61) 3307 2505

APÊNDICE B- Artigo científico submetido a revista American Journal of Medical Genetics.

Title: Intellectual Disability associated to Cardiac malformation in a patient with a *TBL1XR1* microdeletion.

Ana Carolina Vaqueiro^{1,2}, Claudiner Pereira de Oliveira^{1,2}, Mara S. Cordoba³, Beatriz R. Versiani³, Camila Xavier de Carvalho^{1,4,5}, Silviene Fabiana de Oliveira^{1,4,5}, Juliana F. Mazzeu^{1,6,*} and Aline Pic-Taylor^{1,4,5},

1 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

2 Hospital de Apoio - Brasilia, Brazil

3 Hospital Universitário, Universidade de Brasília, Brasilia, Brazil

4 Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasilia, Brazil.

5 Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

6 Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

*Corresponding author

Juliana Forte Mazzeu

Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte – Brasília, Brazil ZIP code: 70910-900

Tel: +55 61 3107 1745

e-mail: julianamazzeu@yahoo.com

Abstract

Rare recurrent chromosomal microrearrangements represent a challenge for clinicians to ensure correlation with phenotype due to paucity of previously described cases. Microdeletions of *TBL1XR1* have been described in only two families so far, both presenting intellectual disability and dysmorphisms. Here we present a patient harboring a *TBL1XR1* microdeletion detected by chromosome microarray analysis. In addition to ID, has dysmorphic features and multiple cardiac malformations thus contributing to phenotypic characterization of this rare microdeletion.

Introduction

Intellectual Disability (ID) affects 1-3% of world general population. Because of its implications on the patient's health and quality of life, this condition represents a great public health problem. The genetic search for the causes of DI remains a challenge; however the high number of DI occurrences associated with other phenotypes, directs the search for genetic diagnosis towards the use of chromosomal analysis, using classical and molecular cytogenetics [Moeschler, 2010]. The modern use of such sensitive pan-genomic techniques has allowed the detection of pathogenic copy number variations (CNV) and the identification of disease-causing genes [Miller et al., 2009].

Here we describe a girl that harbors a microdeletion of *TBL1XR1* gene, which has been previously related to Intellectual Disabilities [Tabet et al., 2014; Pons et al., 2015]. Our patient, in addition to ID, has dysmorphic features and multiple cardiac malformations thus contributing to phenotypic characterization of this rare microdeletion.

Clinical Report

The patient is a 7-year-old girl, last born from unrelated healthy parents that has three male siblings, one of which has mild intellectual disability but is not dysmorphic.

The patient was born after normal delivery at 42 weeks of gestation. She had a birth weight of 2950 g (10th - 25th centile), a birth length of 47 cm (25th – 50th centile) and birth head circumference of 33 cm (10th - 25th centile). Cardiopathy was diagnosed at three months of age and the abnormalities involved atrial (ASD) and ventricular (VSD) septum defects, a persistent truncus arteriosus (PTA) and moderate mitral insufficiency. The ASD and the VSD had spontaneous resolution, however, surgery was performed to correct PTA at 5 months of age, and the patient remained with a persistent laryngeal stridor after extubation. During the first 6 months of life, failure to thrive was observed. During this period, the patient was exclusively breastfed.

At 14 months the child had a weight of 6,320g (< 3rd centile), a length of 67 cm (< 3rd centile) and head circumference of 42,5 cm (< 2nd centile), hand length 7,0 cm (< 3rd centile), middle fingers length 2,6 (< 3rd centile). Motor development was normal, she was able to crawl at 7 months, to stand unaided at 12 months, and started to walk at 15 months old. Language development was significantly delayed; she spoke her first words only at 30 months, and was only able to form sentences at the age of five. The patient is agitated and has a compulsive behavior, particularly would recurrently peak at healing wound. Hearing evaluation suggests normal hearing. Facial characteristics (Figure 1) included square face, frontal bossing, midface hypoplasia, sparse eyebrows, bilateral epicanthus, hooded eyes, bulbous nose, long philtrum, thin lips, crowded teeth, narrow palate, large pointed chin. Hands are short with brachydactyly and clinodactyly of the fifth finger bilaterally. She has

cutaneous syndactyly between 2nd and 3rd toes. In addition, it was observed that lower left limb was thicker than the right with protruding visible veins.

A cranial tomography revealed premature closing of the sagittal suture and antero-posterior growth of the cranium, although scaphoid skull was not visible. In addition, the exam showed a low position of the cerebellar tonsils consistent with Chiari I malformation that was so far asymptomatic.

Materials and Methods

Karyotyping

Standard G banding blood karyotype was determined for the patient, by standard procedures.

Screening for 22q microdeletion

Screening for 22q and other microdeletion syndromes was performed using SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes probemix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

Chromosomal Microarray

CMA was performed with a CytoScan 750K array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The platform is composed of 550,000 non-polymorphic CNV probes and more than 200,000 SNP probes with an average resolution of 100 kb. The data were analyzed by using Chromosome Analysis Suite v2.1 Software (Affymetrix). The February 2009 human reference sequence (GRCh37/Hg19) was used for genomic assembly.

Results

The G-banding karyotype for the patient was 46,XX. The MLPA result shows no Copy Number Variation (CNV) on the critical regions classically related to syndromic intellectual disability screened with the SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes probemix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Chromosomal microarray analysis revealed 1,3 Mb-microdeletion on chromosome 3q26.32: arr [hg19] 3q26.32 (176,025,379-177,377,006) (Figure 1B) encompassing one coding gene, *TBLX1R1* and part of a long non-coding RNA *LINC00578*. The phenotypically normal mother and the brother with ID do not carry the microdeletion. Father was not available for testing. A second microdeletion was identified at 2p22.3 arr[hg19] 2p22.3(33,460,847-34,777,068)x1 and considered possibly benign for being present in the mother.

Discussion

The genetic search for the causes of ID and related neurodevelopmental disorders are challenging due to clinical and genetic heterogeneity, hence the identification of single gene involved in the genesis of this disorder represent hopes for improving diagnostic process and offer new targets for therapy.

This work presents a patient with a microdeletion of a single gene, the *TBLX1R1*, who present mild intellectual disabilities, dysmorphic features, and cardiac malformation. Literature revision revealed two other publications that have also identified patients with similar deletions including *TBLX1R1* gene. Combined, the data provided here is important in defining the phenotype linked with the haploinsufficiency of the *TBLX1R1* gene and its role in Intellectual Disability and other phenotypes.

Pons and coworkers [2015], described a familial case of a 708 kb microdeletion involving only the *TBLX1R1* gene, the inherited deletion on an 8-year-old girl was passed on from her mother, both presenting syndromic ID, mostly related to language development delay. At the same year, Tabet and coworkers [2014] described a 6-years-old girl with a 1.6 Mb deletion that contained the last exon of *NAALADL2* gene, the *TBLX1R1* gene, five pseudogenes (LOC442097, EI24P1, LOC100131216, MTND5P15, and ASS1P7) and a putative non-coding RNA (uncharacterized LOC100505547). Although this deletion is larger, the patient phenotype is similar to the patient described here and the family described by Pons et al. (2014).

Six other cases of microdeletion including the *TBLX1R1* gene were briefly described in the DECIPHER database, (249559, 249927, 258003, 263688, 280844, 289477), but represent larger CNVs containing several characterized genes, and little or no description of patients phenotype.

Our patients phenotype is consistent with previous reports by Pons et al., [2015] and Tabet et al.,[2014]. Taken together, the main clinical signs of the *TBLX1R1* gene deletion includes mild to moderate intellectual disability, delayed language development and a pointed chin (present in all 4 patients described). In most of the patients (three out of four), it was also observed dental crowding, low set ears, clinodactyly of the 5th finger, partial syndactyly of 2nd and 3rd toes and long fingers and thumbs. Cardiac defects were not reported previously.

In addition, point mutations in *TBLX1R1* gene were reported by O’Roak and coworkers [2012a and 2012b]. They identified two de novo *TBLX1R1* mutations (p.Leu282Pro) and (p.Ile397Serfs19) in different patients, both presenting autism spectrum disorders (ASD) and severe ID with no other obvious dysmorphisms.

The *TBLX1R1* gene (transducin beta-like 1 X-linked receptor 1-

NM_024665 – OMIM 608628), also known as *TBLR1* or *IRAI*, encodes a protein of 515-amino acids, which contains seven WD40 domains and one LisH (lis homology) domain that mediates protein di- and tetramerization. The TBL1XR1 is a nuclear protein found in most tissues. It was originally identified as a component of the SMRT/N-CoR corepressor complexes that regulate multiple signal transduction pathways and gene transcriptions, including the nuclear receptor and Wnt/ β -catenin pathways, among others [Zhang *et al*, 2002; Li and Wang, 2008; Perissi *et al*, 2008]. It interacts with histones H2B and H4, and plays a role in transcription mediated by nuclear receptors by regulating the switch from gene repression to gene activation during mammalian development [Perissi *et al*, 2008]. The switch mechanism depends on the interaction of the nuclear receptor complex with different co-activators or co-repressors, directing the nucleus to transcriptional activation or repression. In addition, TBL1XR1 also plays an important role in Wnt signaling, which influences biological processes such as determination of cellular polarity, proliferation, and migration; craniofacial and neural development; cardiac development; tumorigenesis and metastasis; and stem cell differentiation and renewal [Flaherty *et al*, 2011].

The canonical Wnt signal transduction pathway requires Wnt molecules to bind the Fz–LRP5/6 receptor complex which results in the cytoplasmic stabilization and nuclear accumulation of b-catenin where it complexes with T-cell factor/lymphoid enhancer factor to modulate transcription of Wnt Family genes [Flaherty *et al*, 2011]. It has been demonstrated that enhancing the binding of TBL1XR1 (TBLR1) leads to an increase in b-catenin-mediated Wnt activation [Choi *et al*, 2011]. The b-catenin–Tcf-mediated Wnt pathway of signaling has been described as essential for normal brain function, thus placing TBL1XR1 as a likely candidate in the genesis of ID [Saito *et al*, 2014].

The role of *TBL1XR1* on Wnt signaling and the consequences of this pathway on both brain and cardiac development corroborates the phenotype of our described patient and makes *TBL1XR1* a good candidate to explain ID and cardiopathy associations.

References

- Choi, H-K, Choi, K-C, Yoo, J-Y, Song, M, Ko, SJ, Kim, CH, Ahn, J-H, Chun, K-H, Yook, JI, Yoon, H-G. 2011. Reversible SUMOylation of TBL1-TBLR1 regulates β -catenin-mediated Wnt signaling. *Mol. cell* 43: 203–216.
- Flaherty, MP, Kamerzell, TJ, Dawn, B. 2009. Wnt signaling and cardiac differentiation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 111: 153–174.
- Li, J, Wang, CY. 0. TBL1–TBLR1 and β -catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis.
- Miller, DT, Adam, MP, Aradhya, S, Biesecker, LG, Brothman, AR, Carter, NP, Church, DM, Crolla, JA, Eichler, EE, Epstein, CJ. 2009. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 749–764.
- Moeschler, J. 2010. Neurodevelopmental Disabilities: Global Developmental Delay, Intellectual Disability, and Autism. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier.
- O’Roak, BJ, Vives, L, Fu, W, Egertson, JD, Stanaway, IB, Phelps, IG, Carvill, G, Kumar, A, Lee, C, Ankenman, K. 2011a. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338: 1619–1622.
- O’Roak, BJ, Vives, L, Girirajan, S, Karakoc, E, Krumm, N, Coe, BP, Levy, R, Ko, A, Lee, C, Smith, JD. 2011b. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485: 246–250.
- Perissi, V, Aggarwal, A, Glass, CK, Rose, DW, Rosenfeld, MG. 2004. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116: 511–526.
- Pons, L, Cordier, MP, Labalme, A, Till, M, Louvrier, C, Schluth-Bolard, C, Lesca, G, Ederly, P, Sanlaville, D. 2015. A new syndrome of intellectual disability with dysmorphism due to *TBL1XR1* deletion. *Am. J. Med. Genet. Part 167A*: 164–168.
- Saitsu, H, Tohyama, J, Walsh, T, Kato, M, Kobayashi, Y, Lee, M, Tsurusaki, Y, Miyake, N, Goto, Y-I, Nishino, I, Ohtake, A, King, M-C, Matsumoto, N. 2014. A girl with West syndrome and autistic features harboring a de novo *TBL1XR1* mutation. *J. Hum. Genet.* 59: 581–583.
- Tabet, A-C, Leroy, C, Dupont, C, Serrano, E, Hernandez, K, Gallard, J, Pouvreau, N, Gadiisseux, J-F, Benzacken, B, Verloes, A. 2014. De novo deletion of *TBL1XR1* in a child with non-specific developmental delay supports its implication in intellectual disability. *Am. J. Med. Genet.* 164: 2335–2337.
- Zhang, J, Kalkum, M, Chait, BT, Roeder, RG. 2002. The N-CoR-HDAC3 Nuclear receptor Corepressor Complex Inhibits the JNK Pathway through the Integral Subunit GPS2. *Mol. Cell* 9: 611–623.