



2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da etiologia do autismo utilizando a
técnica de MLPA.

Estudo da etiologia do autismo utilizando a técnica de MLPA.

Tânia Sofia da Trindade Afonso

Tânia Sofia da Trindade Afonso

2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da etiologia do autismo utilizando a técnica de MLPA.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Marques Carreira (Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Carmen Alpoim (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Tânia Sofia da Trindade Afonso

2011

Agradecimentos

O trabalho experimental desenvolvido e do qual resultou esta tese foi realizado no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Ao finalizar este trabalho gostaria de agradecer a todos que para ele contribuíram de forma directa ou indirecta para a sua elaboração.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, orientadora deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento por todo o apoio, orientação científica, pedagógica e análise crítica desta tese, assim como a cedência das infra-estruturas e equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Carmen Alpoim por ter aceite ser minha orientadora interna, por toda a ajuda e disponibilidade.

À equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica, agradeço todo o apoio, colaboração, disponibilidade demonstrado ao longo da realização deste trabalho.

Ao José Ferrão e Susana Ferreira gostaria de agradecer a orientação científica, apoio, disponibilidade demonstrados.

Aos médicos do Hospital Pediátrico expresso o meu muito obrigado pelas amostras e levantamento dos processos clínicos dos pacientes.

Às minhas amigas e colegas de estágio, Sara, Ilda e Vânia, um muito obrigado por todo apoio e amizade.

Às minhas colegas de mestrado, Rita, Catarina, Priscila, Sabrina, Sónia, Maria João, pelas horas de estudo, de conversa e por serem quem são.

Às minhas amigas dos tempos de Vila Real, Alexandra, Cidália, Margarida, Sofia, Magda, Marta, Cátia, Cláudia, Teresa. Ao meu padrinho de curso Nuno Costa e ao Nuno Esteves. Obrigada por toda a amizade e apoio ao longo destes anos!

Aos meus amigos da minha cidade natal que apesar da distância a amizade continuou, Carina, Gisela, Jéssica, Pedro, Cristiana F., Cristiana P., Daniela e Raul.

À minha mãe, que sempre confiou e acreditou em mim. Ao meu irmão Pedro, por apoiar-me e estar do meu lado. Ao Pedro Ferreira, por toda auxílio e apoio.

À minha avó Benvinda, por ser aquela pessoa especial! Ao meu avô Manuel, pelo encorajamento e apoio! Aos meus tios Manuel e Maria, pelas palavras de incentivo! Aos meus padrinhos e à sua família! A toda a família Trindade por nos darmos todos tão bem.

Ao meu pai, que está e estará sempre ao meu lado.

À família Afonso, em especial aos meus tios Fernando e Clara e aos seus filhos e netos, por sempre me ajudarem, apoiarem e estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

Mais uma vez obrigada a todos!

Lista de abreviaturas e símbolos

ADA - *adenosine deaminase gene*

AGTR2 - *angiotensin II receptor, type 2 gene*

APBA2- *amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 gene*

array-CGH - *array-comparative genomic hybridization*

ASD - *autism spectrum disorders*

ATP10A - *ATPase class V type 10A gene*

BDNF - *brain-derived neurotrophic factor gene*

bp – *base pairs*

BP1 - *breakpoint 1*

BP4- *breakpoint 4*

BP5 - *breakpoint 5*

CAPS2 - *calyphosine-2 is a calcium-binding protein with 2 EF-hand gene*

CD2BP2 - *cd2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2 gene*

CI- *centro de imprinting*

CHRNA7 - *neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 gene*

CNVs - *copy number variations*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

dNTPs - *deoxynucleotide triphosphates*

DOC2A - *double C2-like domains, alpha gene*

E6-AP - *E6-associated protein*

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*

EN2 - *homeobox protein engrailed gene*

FISH - *fluorescent in situ hybridization*

FOXP2 - *forkhead box P2 gene*

GABA - *gamma-aminobutyric acid*

GABAA- *gamma-aminobutyric acid type A*

GABAR – *gamma-aminobutyric acid receptor*

GABRB3 - *gamma-aminobutyric acid A receptor beta 3 gene*

GluR6 - *glutamate receptor 6*

GRM8 - *glutamate receptor, metabotropic 8 gene*

GTG - *giemsa-tripsina-giemsa*

HCL - *hydrochloric acid*

HIRIP3 - *hira interacting protein 3 gene*

HOXA1 - *homeobox A1 gene*

KLF13 - *kruppel-like factor 13 gene*

LAMB1 - *laminin, beta 1 gene*

LCRs - *low copy repeats*

LOH - *loss of heterozygosity*

MAPK3 - *makorin ring finger protein 3 gene*

Mat – *materna*

MAZ - *myc-associated zinc finger protein gene*

Mb - *mega bases*

MECP2 – *methyl-CpG-binding protein 2 gene*

MED - *domínio de expressão materna*

MLPA - *multiplex ligation-dependent probe amplification*

MTMR15 - *myotubularin related protein 15 gene*

MVP - *major vault protein gene*

NLGN3 - *neuroligin-3 gene*

NLGN4 - *neuroligin-4 gene*

NPTX2 - *neuronal pentraxin II gene*

NRXN1- *neurexin-1-alpha gene*

NT-3 - *neurotrophin-3 gene*

OCA2 - *oculocutaneous albinism II gene*

OT - *oxitocina*

Pat – *paterna*

PCR - *polymerase chain reaction*

PDD - *perturbações persuasivas do desenvolvimento*

PEA - *perturbações do espectro de autismo*

RELN - *reelin gene*

SCG5 - *neuroendocrine protein 7B2 gene*

SEZ6L2 - *seizure-related 6 homolog (mouse)-like gene*

SHANK3 - *sh3 and multiple ankyrin repeat domains 3 gene*

SLC6A4 - *solute carrier family 6 member 4*

SNC - *sistema nervoso central*

SNRPN - *small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N gene*

SPN – sialophorin gene

TE - tris-EDTA

TJP1 - tight junction protein 1 gene

UBE3A - ubiquitin-protein ligase E3A gene

UCSC - University of California, Santa Cruz

WNT2 - wingless-type MMTV integration site family member 2 gene

5-HTT - serotonin transporter gene

Índice de Geral

Agradecimentos	III
Lista de abreviaturas e símbolos	V
Índice de Geral.....	VIII
Índice de Figuras.....	X
Índice de Tabelas.....	XI
Resumo	XII
Abstract.....	XIII

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. Autismo.....	1
1.1.1. Prevalência das PEA.....	2
1.1.2. Diagnóstico do autismo.....	2
1.1.3. Etiologia do autismo	3
1.1.4. Epigenética do autismo.....	4
1.1.5. Estudos de regiões e genes candidatos.....	6
1.1.5.1. Região do cromossoma 15q11-q13.....	10
1.1.5.2. Região do cromossoma 16p11.2.....	13
1.1.5.3. Região do cromossoma 22q13.3.....	14
1.2. Tecnologias para o estudo da etiologia do autismo.....	14
1.2.1. Citogenética convencional	15
1.2.2. <i>Fluorescent in situ Hybridization (FISH)</i>	16
1.2.3. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)</i>	18
1.2.4. <i>Array comparative genomic hybridization (array-CGH)</i>	20
1.3. Objectivos.....	21

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupo de estudo.....	22
2.2. Citogenética convencional.....	23
2.3. <i>Multiplex ligation dependent-Probe Amplification (MLPA)</i>.....	23
2.3.1. Extração de DNA.....	23
2.3.2. Determinação da concentração de DNA e grau de pureza	24
2.3.3. Reacção de MLPA	24

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados gerais	26
3.2. Paciente 12	27
3.3. Paciente 14	33
3.4. Paciente 15	36

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES

Conclusões	40
Referências Bibliográficas.....	42

Índice de Figuras

Figura 1 - Interecção dos factores envolvidos na patologia autista.....	3
Figura 2 - Regiões cromossómicas associadas ao autismo.....	6
Figura 3 - Ideograma do cromossoma 15.....	10
Figura 4 - Representação esquemática da região 15q11-q13.....	11
Figura 5 - Ideograma do cromossoma 16.....	13
Figura 6 - Ideograma do cromossoma 22.....	14
Figura. 7- Cariograma humano (46,XY) com bandagem GTG.....	15
Figura 8 - Representação esquemática da técnica de FISH.....	17
Figura 9 - Descrição geral das etapas envolvidas na reacção de MLPA.....	19
Figura 10 - Representação esquemática da técnica de array-CGH.....	20
Figura 11 - Pacientes estudados distribuídos através da faixa etária e género....	26
Figura 12 - Incidência de alterações no grupo de estudo.....	27
Figura 13 - Cariograma com bandas GTG de um paciente com o complemento 46XY..	28
Figura 14 - Heredograma da família do paciente 12 com a descrição fenotípica.....	30
Figura 15 - Representação esquemática da região duplicada no paciente 12 e a sua localização no cromossoma 15.....	31
Figura 16 - Representação esquemática de duplicações 15q herdadas por via materna, de pacientes reportados nos estudos apresentados na figura.....	32
Figura 17 - Representação esquemática da região deletada no paciente 14, a sua localização no cromossoma 16 e a comparação com outras deleções encontradas noutros estudos.....	35
Figura 18 - Possível explicação para a formação da deleção (seta verde) e duplicação (seta vermelha) que poderá ocorrer na gametogénese	36
Figura 19 - Representação esquemática onde se pode ver a deleção do paciente 15 sua localização no cromossoma 15 em comparação com outras deleções encontradas noutro estudo.....	39

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Informação dos pacientes incluídos no estudo, todos referenciados com manifestações de autismo.....	22
Tabela 2 - Sondas usadas utilizadas e genes estudados incluídos no painel SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1.....	25
Tabela 3- Alterações encontradas no grupo de pacientes por MLPA.....	27
Tabela 4 - Tabela 4 - Resultados obtidos através da análise do Software <i>Coffalyser</i>, no paciente 12, mostrando a duplicação nos <i>loci</i> (<i>SNRPN-HB2-85M</i>, <i>UBE3A</i>, <i>ATP10A</i>, <i>GABRB3</i>, <i>OCA2</i>) na região, utilizando o painel de sondas P343-B1.....	29
Tabela 5- Resultados obtidos através da análise do Software <i>Coffalyser</i> no paciente 14, com deleção dos <i>loci</i> (<i>SPN</i>,<i>MAZ</i>,<i>MVP</i>,<i>SEZ6L2</i>,<i>HIRIP3</i>,<i>DOC2A</i>,<i>MAPK3</i>) na região 16p11.2, utilizando o painel de sondas P343-B1.....	33
Tabela 6 - Resultados obtidos através da análise do Software <i>Coffalyser</i> no paciente 15, com deleção dos <i>loci</i> (<i>MTMR15</i>,<i>TRPM1</i>,<i>KLF13</i>,<i>CHRNA7</i>) na região 15q13, utilizando o painel de sondas P343-B1.....	37

Resumo

O autismo é um distúrbio do desenvolvimento e apresenta uma incidência cerca de 34/10000 indivíduos. Esta patologia manifesta-se na infância, persistindo ao longo da vida e pode dar origem a uma grande variedade de quadros clínicos, tais como, dificuldades de interação social e de comunicação, comportamentos repetitivos e estereotipados. Os factores genéticos representam um papel importante, apesar da sua origem por vezes incerta e numa taxa relevante de casos o diagnóstico etiológico é desconhecido. Porém, regiões cromossómicas, tais como, 15q11-q13, 16p11 e o 22q13.3 têm sido associadas ao autismo. O objectivo deste trabalho é relacionar as manifestações do espectro do autismo com alterações cromossómicas submicroscópicas, das regiões 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13.3, através da técnica de MLPA, avaliando a sua incidência na população em estudo. Foram encontradas anomalias cromossómicas em três pacientes, duas na região 15q11.2-q13.3 e uma na região 16p11.2, comprovando a sua importância na etiologia do autismo. A técnica de MLPA revelou ser adequada na pesquisa direcionada de alterações cromossómicas e é uma mais valia num laboratório de diagnóstico.

Palavras-chaves: autismo, 15q11-q13, 16p11.2, 22q13.3, perturbações do espectro de autismo (PEA), genes, MLPA

Abstract

Autism is a developmental disorder and has an incidence of about 34/10000 individuals. This pathology manifests itself in childhood and persists throughout life and can give rise to a wide variety of clinical manifestations, such as difficulties in social interaction and communication, repetitive and stereotyped behaviors. Genetic factors play an important role, despite its origins sometimes uncertain. In most of the cases its etiology is unknown. In some cases chromosomal rearrangements are the most commonly identified abnormalities. There are certain chromosomal regions that have been most associated with autism, as for example the regions 15q11-q13, 16p11 and 22q13. The aim of this work is to relate the manifestations of the autism spectrum with the above submicroscopic chromosomal changes through the MLPA technique, assessing its impact in the population. Chromosomal abnormalities were found two in region 15q11-q13 and one in 16p11.2 confirming its importance in the autism etiology. The MLPA technique has proved suitable for the research of chromosomal abnormalities and is an asset in a diagnostic laboratory.

Keywords: autism, 15q11-q13, 16q11.2, 22q13.3, autism spectrum disorders (ASD), genes, MLPA

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. Autismo

O autismo foi pela primeira vez referido por Leo Kanner, em 1943, para definir uma condição observada num grupo de 11 crianças, na sua maioria rapazes, com um atraso no desenvolvimento (Kanner, 1943). As características do autismo, descritas por Kanner, são alterações no comportamento, na interacção social recíproca, comunicação verbal e comportamentos estereotipados (Lorde *et al.*, 2000). É durante a infância que o autismo se manifesta, geralmente antes dos 3 anos de idade, verificando-se atraso no desenvolvimento da linguagem e interacção social, aparecendo mais tarde os comportamentos repetitivos e isolamento social (Wing, 1997). Um ano mais tarde, e sem conhecimento da descrição de Kanner, Hans Asperger descreveu quatro pacientes com comportamentos similares (Asperger, 1944). Foram necessárias décadas desde a primeira descrição para que o autismo fosse reconhecido como uma patologia de etiologia complexa, tendo a genética um papel importante (Wing, 1997; Folstein e Rosen-Sheidley, 2001).

As perturbações do espectro de autismo (PEA) consistem no conjunto de perturbações do comportamento e desenvolvimento neuronal, de etiologia bastante heterogénea e em parte desconhecida. Esta patologia caracteriza-se por desvios em três categorias: interacção social, comunicação verbal e comportamentos repetitivos e estereotipados (Wing, 1997; Folstein e Rosen-Sheidley, 2001). Num dos extremos do espectro de autismo encontram-se indivíduos com baixo potencial cognitivo, deficiências na comunicação verbal e com comportamentos repetitivos acompanhados de défice cognitivo. No outro extremo do espectro de autismo, encontram-se indivíduos que possuem elevado potencial cognitivo, como os indivíduos afectados com Síndrome de Asperger, caracterizados por défices na interacção social, com comportamentos estereotipados e repetitivos, mas nenhum atraso no desenvolvimento da linguagem (Berlinger and Smith, 2001).

No grupo das PEA, os indivíduos que possuem um fenótipo clínico diferente dos padrões de autista pertencem ao grupo de perturbações globais de desenvolvimento não especificadas. As PEA integram-se no conjunto clínico de perturbações globais de desenvolvimento, nos quais se define como o conjunto de distúrbios clínicos com início precoce que afectam simultaneamente múltiplas áreas básicas do comportamento e desenvolvimento, onde se incluem também o Síndrome de Rett e o distúrbio desintegrativo da segunda infância (Wing, 1997; Oliveira *et al.*, 2007).

1.1.1. Prevalência das PEA

A prevalência da perturbação autista é aproximadamente 20 para 10 000 indivíduos. Para todas as perturbações do espectro de autismo é de 60 para 10 000 crianças. Os indivíduos de sexo masculino apresentam uma probabilidade quatro vezes superior de serem afectados, comparativamente com os do sexo feminino (Chakrabarti e Fombonne, 2005). No entanto, o sexo feminino afectado com autismo ou com perturbações persuasivas do desenvolvimento (PDD), tende a ser mais comprometido cognitivamente, mas menos afectado socialmente, relativamente ao sexo masculino (Volkmar *et al.*, 1993). Em Portugal continental e nos Açores a prevalência da PEA, em 2007, era cerca de 10 em 10 000 crianças (Oliveira *et al.*, 2007).

O aumento da incidência de PEA que se tem verificado nos últimos anos tem despertado a atenção da comunidade científica, vários estudos têm sido feitos no sentido de compreender a sua etiologia. No entanto, apenas 10-20% dos indivíduos com PEA têm etiologia conhecida (Abrahams e Geschwind, 2008).

1.1.2. Diagnóstico do autismo

O diagnóstico do autismo é feito através da avaliação comportamental por profissionais experientes, recorrendo à investigação detalhada do desenvolvimento da criança e do historial familiar. A investigação de possíveis causas, como distúrbios

físicos ou psicológicos é realizada com base em electroencefalogramas, análises cromossómicas, bioquímicas e genéticas (Wing, 1997).

1.1.3. Etiologia do autismo

O autismo é uma doença complexa, em que a etiologia é desconhecida na maior parte dos casos. A heterogeneidade de fenótipos deve-se provavelmente ao conjunto da interacção entre múltiplos genes, vias biológicas e factores ambientais (figura 1).



Figura 1- Interecção dos factores envolvidos na patologia autista.

A causa do autismo é na sua maioria idiopática, todavia também pode estar associado a outras condições médicas conhecidas, como Síndrome de X-Frágil e Esclerose Múltipla. Podendo ainda estar associada a outras anomalias cromossómicas e distúrbios metabólicos (Folstein e Rosen-Sheidley, 2001; Abrahmas e Geschind, 2008; Muhle *et al.*, 2004).

Têm sido descritas em pacientes com autismo, múltiplas anomalias cromossómicas como translocações, inversões, duplicações e deleções, envolvendo praticamente todos os cromossomas (Folstein e Rosen-Sheidley, 2001).

No entanto, as anomalias citogenéticas mais comuns ocorrem na região 15q11-q13, encontrando-se esta região alterada em 1% a 3% dos autistas. Esta região inclui a região crítica para os Síndromes de Prader-Willi e Angelman (em deleção)

que está descrita na literatura como estando sujeita a *imprinting* genómico (Gillberg, 1998; Castermans *et al.*, 2004).

A importância da componente genética só se tornou clara na década de 1980, pois até ao momento, a causa era atribuída a deficiências na educação dos pais que teriam lacunas a nível social, tais como, a hipótese das mães “frias” com comportamentos distantes ou a experiências traumáticas em tenra idade (Eisenberg, 1957; Bettelheim, 1967).

No autismo, a recorrência nos familiares é maior em cerca de 2% a 8% em relação à população geral (Muhle, 2004). Nesta patologia, características como défice de interacção social, dificuldades de comunicação e preferência por rotinas, são encontradas mais frequentemente em pais de pacientes afectados em comparação com a população em geral (Muhle, 2004; Folstein and Rosen-Sheidley, 2001). Porém, o risco elevado nos familiares não significa necessariamente que a patologia tenha uma componente hereditária. A frequência do autismo é maior em irmãos de crianças com autismo (2-6%) comparativamente à população em geral. Os estudos em familiares e em gémeos têm demonstrado que o risco para o autismo é largamente determinado por factores genéticos (>90%). Na verdade verifica-se que cerca de 60-90% dos gémeos monozigóticos são concordantes para a perturbação do espectro do autismo, comparativamente aos cerca de 10% nos gémeos dizigóticos (Folstein e Rosen-Sheidley, 2001; Muhle *et al.*, 2004, Abrahams e Greshwind, 2008). A possível causa da variabilidade fenotípica do autismo poderá ser o resultado do efeito de múltiplos genes e da sua interacção com as vias biológicas e bioquímicas de desenvolvimento cerebral, (Levitt e Campbell, 2009). Os endofenótipos são pequenos grupos que estão relacionados com os sintomas comportamentais que retratam hipoteticamente um subgrupo genético e/ou mecanismos patofisiológicos envolvidos no fenótipo total do autismo (Dykens *et al.*, 2004; Steyaert e Marche, 2008).

1.1.4. Epigenética do autismo

Para além da interacção dos factores genéticos e ambientais, também novas mutações e/ou mecanismos epigenéticos, como o *imprinting* genómico ou

epimutações, podem contribuir para a susceptibilidade genética do autismo (Schanen, 2006).

O *imprinting* genómico regula a expressão dos genomas materno e paterno nos mamíferos, resultando na expressão monoalélica dos genes sujeitos a *imprinted*. Este processo é vital para uma expressão génica correcta num indivíduo, uma vez que erros de *imprinting* podem resultar numa transcrição génica ou silenciamento génico inapropriados, causando por vezes os chamados síndromes de *imprinting*, tais como os síndromes de Prader-Willi e Angelman, entre outros (Reik & Walter, 2001).

A expressão monoalélica dos genes sujeitos a *imprinting* depende de uma marca epigenética que permita distinguir a origem parental de ambos os alelos. Modificações epigenéticas são definidas como alterações químicas do material genético que regulam a função de um gene sem que a sequência de bases no DNA seja alterada. As marcas de *imprinting* têm obrigatoriamente que ser herdadas durante a divisão celular, para que possam ser removidas durante a gametogénese e ter efeito na expressão génica (Wigler *et al.*, 1981; Bird, 1986).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética crucial do genoma que está envolvida na regulação de muitos processos celulares. Estes incluem o desenvolvimento embrionário, a transcrição, a estrutura da cromatina, a inactivação do cromossoma X, o *imprinting* genómico e a estabilidade cromossómica (Riggs e Pfeifer, 1992; Razin e Cedar, 1994; Neumann e Barlow, 1996; Wolffe e Matzke, 1999). A metilação ocorre em nucleótidos de citosina localizados nas ilhas CpG, uma sequência promotora do gene, resultando no silenciamento transcripcional (Bittel *et al.*, 2007).

Os fenómenos epigenéticos são transmissíveis e representam um estado alternativo da actividade génica que não é explicável por mutação, alterações sequenciais ou regulação normal do desenvolvimento. A metilação faz parte de um sistema tão importante quanto o conjunto de genes de um genoma que as células usam para determinar onde e quando um determinado gene vai ser expresso durante o desenvolvimento. As marcas epigénicas são herdadas durante a divisão celular, mas não alteram a sequência de DNA (Robertson, 2005).

1.1.5. Estudos de regiões e genes candidatos

Os genes associados ao autismo são genes envolvidos em vias biológicas patofisiologicamente relevantes ou localizados em regiões cromossômicas susceptíveis a alterações (Ott, 1999).

A base genética do autismo é complexa, a transmissão não segue a herança mendeliana simples, nem está associada apenas a um gene. Deve-se à existência de vários genes e à interação entre eles. Para identificar a base genética do autismo são realizados vários estudos, entre eles, os estudos por citogenética convencional e molecular (Lauritsen *et al.*, 1999; Gillberg *et al.*, 1998; Jacquemont *et al.*, 2006).

Os genes de desenvolvimento relacionados com o sistema nervoso central (SNC), genes do sistema serotoninérgico e de outros sistemas de regulação das funções neurais, além dos genes localizados em pontos de quebras cromossômicos, identificados em pacientes com autismo, têm surgido como genes candidatos (Petit *et al.*, 1995; Wassink *et al.*, 2001; Vicent *et al.*, 2001).

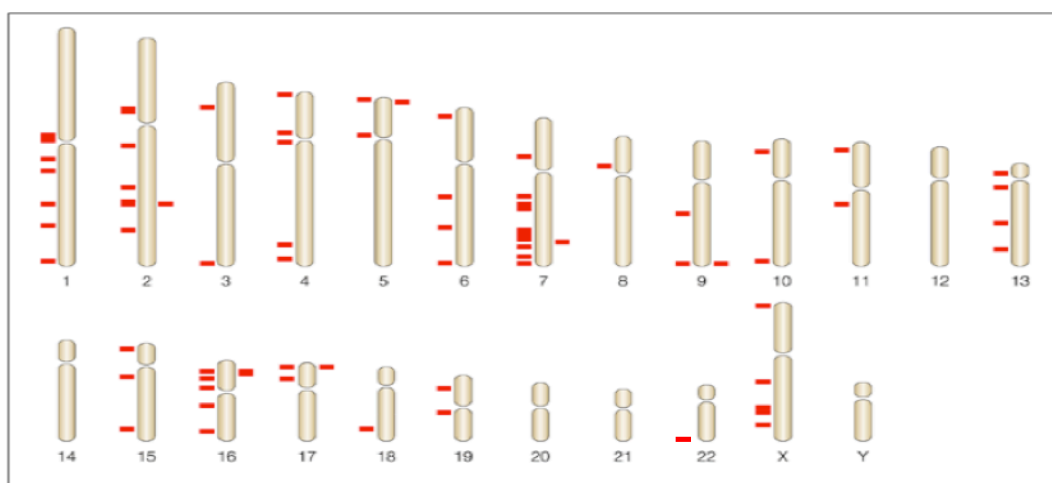


Figura 2 - Regiões cromossômicas associadas ao autismo (adaptado de Sabine, 2006).

Os estudos de *linkage* revelaram regiões envolvidas na etiologia do autismo em quase todos os cromossomos (figura 2). Vários estudos têm demonstrado associação entre autismo e as regiões 2q, 3q25-q27, 6q14-q21, 7q31-q36, 13q, 15q11-q13, 16p11.2, 17q11-q21 e 22p13.3, e regiões do cromossoma X (Veenstra-Vanderweele *et al.*, 2004; Freitag *et al.*, 2007).

A região 3p25-p26 codifica o receptor de oxitocina (OT), que está associado ao autismo. Têm sido detectados em pacientes autistas níveis de OT mais baixos do que nos controlos e estudos em ratos e murganhos mostram que os níveis de OT afectam a capacidade de relacionamento, explicando como este gene está envolvido no fenótipo do autismo (Modahl *et al.*, 1998; Insel *et al.*, 1999; Winslow e Insel, 2002).

As mutações do receptor de glutamato 6 (GluR6), codificado em 6q21 foram observadas em autistas (Jamain *et al.*, 2002). Apenas algumas mutações podem afectar a função da proteína, mas devido à importância do glutamato no desenvolvimento do cérebro, na aprendizagem e na memória, as alterações no sistema glutamatérgico observados em pacientes demonstra que este pode ser importante na patogénese da doença (Muhle *et al.*, 2004; Freitag, 2007).

O cromossoma 7 também é referenciado na literatura como tendo muitos genes associados ao autismo. Encontram-se neste cromossoma, o *FOXP2*, o *LAMBI*, o *EN2*, o *HOXA1*, o *GRM8*, o *NPTX2*, o *WNT2*, o *RELN* e o *CAPS2* (Muhle *et al.*, 2004; Conciatori *et al.*, 2004; Serajee *et al.*, 2003; Skaar *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2002; Gharani *et al.*, 2004; Wassink *et al.*, 2001). As mutações do *FOXP2* estão associadas com alterações de linguagem, *LAMBI* promove migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC, o *GMR8* é outro receptor de glutamato e *NPTX2* é importante para a sinaptogénese. O *RELN* está envolvido na migração neuronal, na formação do córtex cerebral e na sinaptogénese. As alterações deste gene afectam o desenvolvimento do cerebelo e do córtex, que corresponde a algumas das anomalias encontradas no autismo (Fatemi *et al.*, 2001). Murganhos knockout para *CAPS2* mostram que a libertação adequada de neurotrofinas (*NT-3* e *BDNF*) mediada por *CAPS2* é essencial para o normal desenvolvimento e funcionamento do cerebelo, incluindo a diferenciação neuronal, morfogénese, sinapse e aprendizagem e controlo motor (Sadakata *et al.*, 2007). Na região 7q22, o gene *RELN*, que codifica uma glicoproteína amplamente secretada na migração neuronal, pode apresentar alterações que afectam o desenvolvimento cortical e cerebelar. De facto, anomalias nos neurónios do cerebelo são uma das causas mais importantes na patologia do autismo (Bailey *et al.*, 1995).

A região 17q11-q12 é relevante por nela se localizar o transportador de serotonina (*SLC6A4*), e, para além disso foram identificadas mutações deste gene em

pacientes autistas, e os níveis de serotonina no plasma são mais elevados em pacientes autistas que na população controlo (Anderson *et al.*, 1987).

As mutações nos genes *MECP2*, *NLGN4* e *NLGN3* codificados no cromossoma X, também têm sido identificadas em indivíduos afectados (Shibayama *et al.*, 2004; Talebizadeh *et al.*, 2006; Beyer *et al.*, 2002; Carney *et al.*, 2003). Os genes *NLGN4* e *NLGN3* são essenciais para a sinaptogénese. No cromossoma X, a região Xq22-q23, onde está mapeado o gene *AGTR2*, é tida como importante (Vervoort *et al.*, 2002). Estudos neste gene têm mostrado que a deleção desta região está associada à elevada frequência de défice cognitivo em indivíduos autistas. No entanto, a região mais significativa é a Xq13-q21, que contém um dos genes da família das neuroliginas. As neuroliginas actuam como mediadoras da interação celular (moléculas de adesão) entre neurónios que possuem receptores do tipo neuroxinas nas suas membranas plasmáticas. São encontradas no lado pós-sináptico das sinapses e parecem ser essenciais para o bom funcionamento das mesmas. Mutações nos genes *NLGN3* e *NLGN4* foram encontradas em duas famílias com membros afectados por autismo e Síndrome de Asperger, sugerindo responsabilidade funcional da sinapse (Ichtchenko *et al.*, 1996; Scheiffele *et al.*, 2000; Jamain *et al.*, 2003).

Os genes que codificam proteínas participantes do sistema serotoninérgico são também fortes candidatos para o estudo em autistas. O mau funcionamento desse sistema pode resultar em depressão, epilepsia, comportamento obsessivo-compulsivo e distúrbios afectivos. De facto, alguns desses genes têm sido estudados em indivíduos afectados, entre eles o gene *5-HTT*, que codifica o transportador de serotonina, e os genes *5-HTRs*, que codificam os seus receptores. No entanto, a relação do gene *5-HTT* com o autismo é ainda controversa (Cook *et al.*, 1997; Klauck *et al.*, 1997; Persico *et al.*, 2000; Zhong, *et al.*, 1999; Maestrini *et al.*, 1999)

Um estudo recente suporta a associação do gene adenosina deaminase (*ADA*) (20q13.12) com o autismo. Alterações no metabolismo das purinas e uma actividade reduzida de *ADA* têm sido observados nos pacientes com autismo (Hettinger *et al.*, 2008; Bottini *et al.*, 2001).

Todos estes genes são potenciais candidatos para explicar o fenótipo autista pelas funções que desempenham e pelos sistemas metabólicos em que actuam. Porém, alguns estudos de associação são contraditórios, possivelmente devido à heterogeneidade de fenótipos da doença. Neste sentido, foi demonstrado que algumas regiões podem estar mais relacionadas com o desenvolvimento do autismo de acordo

com o sexo do paciente ou dos seus progenitores. As regiões 5p15.33, 9p24.1 e 11p13-p12 parecem estar associadas com o desenvolvimento do autismo no género feminino, 5q12.3 e 9q33.3 no género masculino e 2q e 7q em famílias de origem europeia, refletindo a complexidade de factores genéticos que afectam o autismo (Szatmari *et al.*, 2007).

Em pacientes autistas foram também observadas deleções 2q37, 7q31, 22q11 e 22q13.3 (Bolton *et al.*, 2001; Schroer *et al.*, 1998; Lukusa *et al.*, 2004; Ghaziuddin e Burmeister, 1999; Ashley-Koch *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2000; Fine *et al.*, 2005; Manning *et al.*, 2004). As deleções 22q11 são observadas em casos de Síndrome de DiGeorge e Síndrome Velocardiofacial e tendo sido também observada em síndromes com características clínicas comuns com autismo (Freitag, 2007). Rearranjos no cromossoma 16p11.2 têm sido observados em várias desordens neuropsiquiátricas, tornando evidente que duplicações e deleções desta região representam um factor de risco significativo no autismo.

Szatmari e colaboradores, identificaram *CNVs* (*copy number variations*) associados ao autismo. Os rearranjos mais comuns associados com o autismo são duplicações da região 15q11-q13, como demonstrado por estudos anteriores. Neste estudo também observaram quatro deleções em 2p16 que afectam o gene NRXN1, interessante para a origem do autismo, pois participa na sinaptogénese glutamatérgica e, possivelmente, gabaérgica, e interage com neuroquinas, também associadas ao autismo. Estas alterações reforçam a associação do sistema glutamatérgico no autismo (Szatmari *et al.* 2007).

Na região 15q11-q13, por exemplo, o cluster do gene receptor do ácido aminobutírico (GABA) parece estar associado à patogénese do autismo (Volkmar *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2000). Nesta mesma região, o gene UBE3A apresenta expressão predominantemente no cérebro humano (Nurmi *et al.*, 2001; Herzing *et al.*, 2002). Porém, dado que indivíduos com alterações cromossómicas em 15q11-q13 nem sempre são autistas, acredita-se que as modificações nestes genes não são suficientes para o desenvolvimento da doença.

Apesar de todas as discordâncias em relação aos genes candidatos para o autismo, existem ainda boas razões para se acreditar que, uma vez conhecidos os genes envolvidos, novos agentes terapêuticos poderão actuar em alvos moleculares específicos. Na busca desses genes, a identificação de fenótipos quantitativos múltiplos é fundamental na seleção de algumas regiões.

No sentido de uma melhor compreensão do mecanismo da PEA procedeu-se neste trabalho a uma análise mais pormenorizada de três regiões cromossômicas (15q11-q13, 16p11.2 e a 22q13.3), que se acredita poderem contribuir para um melhor entendimento das bases genéticas envolvidas nas PEA.

1.1.5.1. Região do cromossoma 15q11-q13

As anomalias citogenéticas observadas na região 15q11-q13 como duplicações, deleções e inversões estão presentes em 1-4% de pacientes autistas (figura 3) (Gillberg, 1998). As duplicações podem ocorrer como repetições intersticiais em tandem, de tal modo que múltiplas cópias deste *locus* estão presentes no cromossoma ou como cromossoma supranumerário isodicêntrico 15 (um cromossoma 15 extra com uma ou duas cópias da região cromossômica 15q11-q13), levando a trissomia ou tetrassomia de genes no *locus* 15q11-q13. As duplicações da região 15q11-q13 são as anomalias cromossômicas mais frequentes em indivíduos com PEA (Vorstman, 2006).

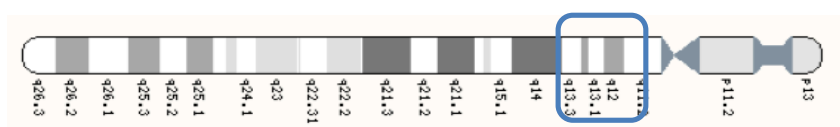


Figura 3 – Ideograma do cromossoma 15 (adaptado de www.ensembl.org).

As anomalias nesta região do cromossoma estão associadas a outras perturbações do neurodesenvolvimento que partilham algumas características com o autismo, especialmente a deleção intersticial do 15q11-q13, que resulta na síndrome de Prader-Willi ou de Angelman, dependendo se a deleção é no cromossoma paterno ou no materno, respectivamente. Estas duas síndromes estão descritas em pacientes com PEA, sendo estimado que mais de metade dos indivíduos com a síndrome de Angelman têm PEA (Bonati *et al.*, 2007).

O controlo da região 15q11-q13 é coordenado pelo *imprinting* genético por toda a região mediado por um centro de *imprinting* (CI) no promotor SNRPN. O domínio de expressão materna contém dois genes de *imprinting*, os genes UBE3A e ATP10C (Kato *et al.*, 2008).

Um desalinhamento durante a meiose I, nas *LCRs* (*low copy repeats*) leva a uma recombinação homóloga não alélica, que forma uma série de pontos de quebra ao longo da região 15q11-q13 (BP1 a BP5), que predispõem o cromossoma 15 a rearranjos genómicos (figura 4) (Hogart *et al.*, 2008).

Cerca de 1% dos autistas apresentam anomalias citogenéticas na região 15q11-q13, através de duplicações intersticiais ou de cromossomas marcadores supranumerários formados pela duplicação invertida do cromossoma 15q proximal.

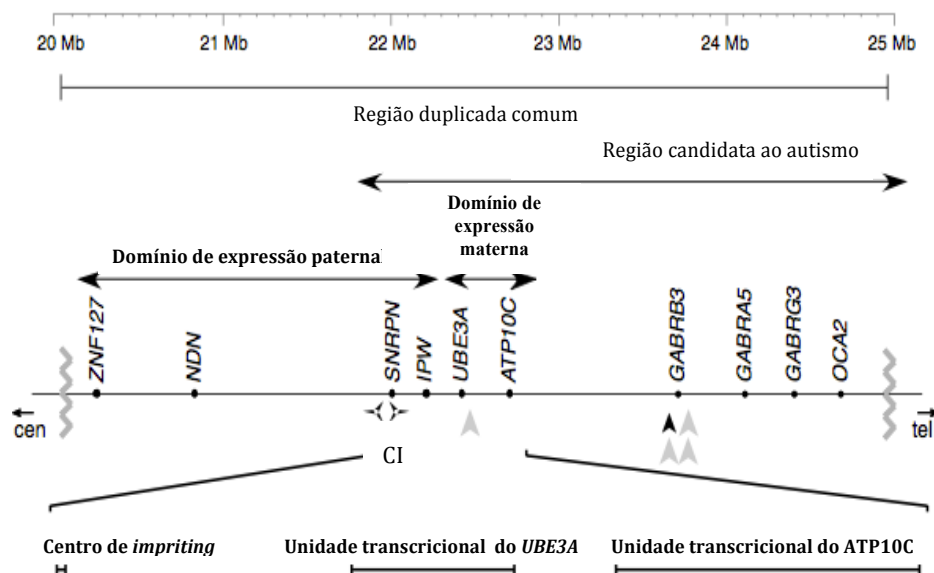


Figura 4 – Representação esquemática da região 15q11-q13. As regiões delimitadas pelas setas indicam os genes associados ao autismo e os genes de expressão materna e paterna (adaptado de Nurmi *et al.*, 2003).

As anomalias citogenéticas do cromossoma 15q11-q13 apontam para vários genes-alvo, sendo de seguida descritos alguns desses genes.

- **GABRB3** (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor beta 3 gene)

O GABRB3 localiza-se na região 15q11.2-q12 e faz parte do cluster receptor do gene γ -amino butyric acid (*GABAA*). Este gene está fortemente implicado na patogénese do autismo, promovendo alterações no desenvolvimento similares às observadas no autismo, inibindo a excitação da via neural e a sua expressão no início do desenvolvimento (Owens e Kriegstein, 2002). É o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central nos mamíferos, controlando, portanto, a excitabilidade do cérebro adulto.

O GABA actua com um complexo GABAR, uma estrutura heteromérica que medeia a inibição sináptica no cérebro adulto. Os receptores GABA têm um papel central na ansiedade e, perturbações nestes receptores podem originar epilepsia.

- **UBE3A** (*ubiquitin-protein ligase E3A gene*)

Em algumas regiões do cérebro normal, o *UBE3A* é apenas expresso a partir do cromossoma materno, verificando-se a sua expressão somente em 10% dos indivíduos com a síndrome de Angelman, que evidenciam deleção 15q11.2 (Vorstman, *et al.*, 2006). Este gene localiza-se na região 15q11-q13 e codifica uma proteína designada de E6-associated protein (E6-AP), que actua como a enzima celular a ubiquitina ligase.

- **CHRNA7** (*Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 gene*)

O gene *CHRNA7*, localizado em 15q14, codifica a subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico neuronal, a qual é uma proteína homopentamérica do canal iónico sináptico. É candidato para a epilepsia e para uma variedade de fenótipos neuropsiquiátricos baseados em associações genéticas com a esquizofrenia e o distúrbio bipolar. Ainda este gene tem sido implicado em distúrbios sensoriais e défices cognitivos (Ben-Shachar *et al.*, 2009).

- **ATP10** (*ATPase class V type 10A gene*)

O gene *ATP10A*, localiza-se na região 15q12 e codifica uma ATPase humana transportadora de aminofosfolípidos. Este gene talvez seja regulado por *imprinting* semelhante ao do gene *UBE3A*. Alguns estudos de associação genética sugerem que o *ATP10A* pode contribuir para o autismo, não havendo concordância quanto aos resultados (Hogart *et al.*, 2008; Schanen, 2006).

1.1.5.2. Região do cromossoma 16p11.2

Em 2008 surgiu pela primeira vez a associação entre a microdeleção 16p11.2 e o autismo (Weiss *et al.*, 2008) (figura 5). As microdeleções e microduplicações da região 16p11.2 estão também a ser identificadas em indivíduos com atraso no desenvolvimento, e têm sido associadas a elevada frequência de atraso no desenvolvimento cognitivo, de linguagem e com problemas comportamentais. Estas características apresentam maior incidência nas microdeleções do que nas microduplicações (Rosenfeld *et al.*, 2010).

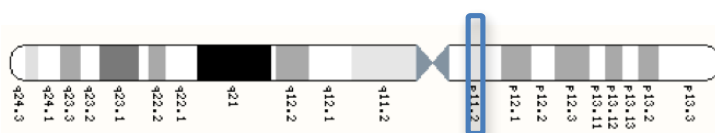


Figura 5 – Ideograma do cromossoma 16 (adaptado de www.ensembl.org).

Características dismórficas, dificuldades na alimentação e infecções recorrentes nos ouvidos parecem ser sintomas comuns na síndrome de microdeleção 16p11.2.

1.1.5.3. Região do cromossoma 22q13.3

As deleções ou duplicações no cromossoma 22q13.3 (figura 6) aparentam ser factores de risco para a perturbação autista, sendo as deleções as anomalias cromossómicas mais comuns associadas a esta patologia (Heilstedt *et al.*, 2003).

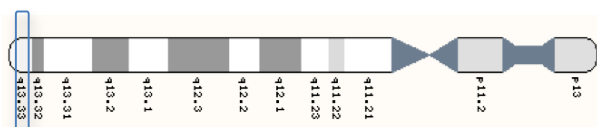


Figura 6 – Ideograma do cromossoma 22 (www.ensembl.org).

A síndrome de microdeleção 22q13.3 está associada a défices cognitivos e caracteriza-se por hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento global e comportamento autista.

- ***SHANK3*** (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 gene*)

O gene *SHANK3* é um candidato para os sintomas neurocomportamentais observados em indivíduos afectados com as deleções 22q13. O *SHANK3*, também conhecido como ProSAP2, está localizado no cromossoma 22q13.3, e codifica uma synaptic scaffolding protein. Este gene foi primeiramente identificado em ratos e posteriormente em humanos, como um gene expresso predominantemente no córtex cerebral e no cerebelo. A presença de anomalia cromossómica por si só parece não ser indicativo de perturbação autista, tendo-se verificado também deleções no *SHANK3* em indivíduos saudáveis (Glessner *et al.*, 2009).

1.2. Tecnologias para o estudo da etiologia do autismo

Existem várias metodologias disponíveis para o estudo das regiões associadas ao autismo. Por norma, o estudo dos casos inicia-se pela citogenética convencional, sendo depois complementado por técnicas de citogenética molecular e biologia molecular.

1.2.1. Citogenética convencional

A citogenética é uma área da genética que estuda o número e a estrutura dos cromossomas da célula.

Em 1970 foi publicado o primeiro cariótipo humano com bandas. Yunis, em 1976 e Uta Franke, em 1978, introduziram as técnicas de bandagem de cromossomas em prometáfase (cromossomas em alta resolução), permitindo um nível de detecção de anomalias muito superior.

Os fundamentos elementares da citogenética convencional são:

- incubação das culturas celulares *in vitro* com colcemida, para a obtenção de metáfases disponíveis para observação microscópica,
- tratamento hipotónico das células em cultura para permitir um melhor espalhamento dos cromossomas em metafase,
- bandagem dos cromossomas que permite que a obtenção de um padrão de bandas escuras e claras característico (Patrinós e Ansorge, 2005).

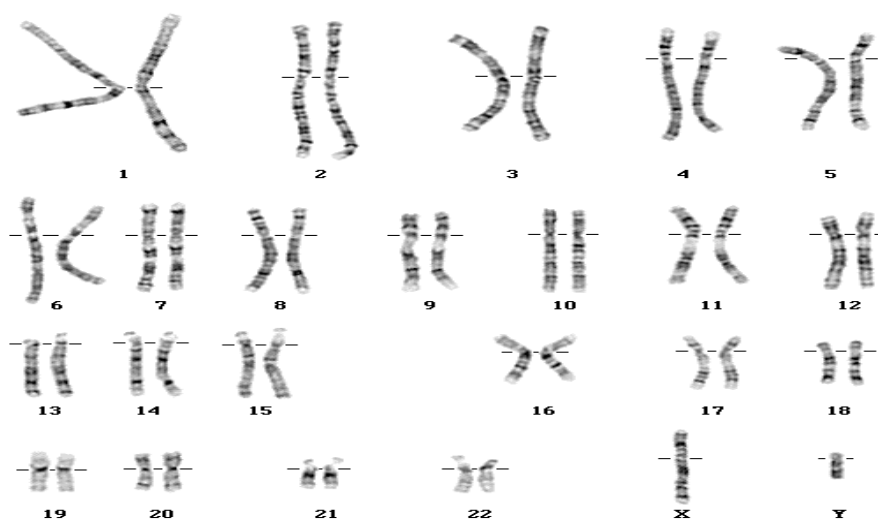


Figura. 7– Cariograma humano (46,XY) com bandagem GTG.

A técnica de bandagem mais comum é a GTG (Giemsa-Tripsina-Giemsa). Esta técnica consiste na incubação com a enzima proteolítica tripsina e coloração com Giemsa (figura 7).

A citogenética convencional possibilita a deteção de anomalias numéricas, estruturais, equilibradas e desequilibradas. A resolução 550 bandas é a mínima aceitável para a identificação de anomalias iguais ou superiores a 3 Mb de extensão.

Esta tecnologia obriga a um período de cultura para a obtenção de cromossomas em metáfase/prometáfase que é dependente do tecido biológico utilizado. O reconhecimento de anomalias nas regiões subteloméricas, devido ao facto destas regiões corresponder, normalmente, a bandas claras na extremidade dos cromossomas. É uma limitativa pelo facto que se recorre frequentemente a outras tecnologias para o seu estudo nomeadamente a FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) e o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Shaffer, 2004).

A citogenética convencional é essencial como primeira abordagem num laboratório de diagnóstico, por permitir analisar a constituição cromossómica do paciente e posteriormente, poder direccionar o estudo de regiões específicas do genoma.

1.2.2. *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH)

A FISH é uma técnica de citogenética molecular que complementa a citogenética convencional, permitindo detectar e localizar sequências específicas de DNA. As sondas marcadas com moléculas fluorescentes (fluorocromos) hibridizam com as regiões dos diferentes cromossomas para as quais apresentam complementariedade. (Van Ommen *et al.*, 1995; Shaffer e Bejjani, 2004).

As sondas de sequência única, subteloméricas, centroméricas e pintura cromossómica são exemplos de sondas usadas pela técnica de FISH (Shaffer e Bejjani, 2004; Dudarewicz *et al.*, 2005).

O método de marcação das sondas pode ser directo ou indirecto. A marcação directa prevê a ligação de um fluorocromo à sonda de DNA, que após a sua hibridação à sequência de DNA complementar da amostra, possibilita a visualização do sinal fluorescente (Nicolini *et al.*, 2004; Murthy e Demetrick, 2006). A marcação indirecta é mais laboriosa requerendo a mediação de anticorpos, sendo os mais comuns a biotina-avidina e a digoxigenina (Gardner e Sutherland, 2004).

Os fluorocromos são visíveis através de microscopia de fluorescência permitindo identificar as sequências complementares do DNA (Verma e Babu, 1995; Fan, 2002) (figura 8).

A técnica de FISH pode ser usada na análise de células em metafase, permitindo detectar pontos de quebra nos cromossomas, deleções, duplicações e identificar material extra de origem desconhecida (Dudarewicz *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2003). Ao contrário da citogenética convencional esta técnica não permite o diagnóstico de células em interfase, não necessitando de cultura celular, levando consequentemente a um diagnóstico mais rápido, se bem que direcionado.

As limitações desta técnica são por exemplo, o facto de ser laboriosa na análise dos resultados, por necessitar de contagem de um elevado número de células (metafases e/ou interfases), com o objectivo de eliminar falsos positivos ou falsos negativos e detectar níveis de mosaicismo (Hultén, *et al.*, 2003; Dudarewicz *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2003; Tepperberg *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2004).

Por vezes, através desta técnica podem surgir resultados inconclusivos, que estão associados a um background inespecífico, que se deve à ligação não específica das sondas fluorescentes ao citoesqueleto, ou devido ao estado de degradação dos cromossomas (D' Alton *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2002).

Por ser uma técnica de elevada sensibilidade, especificidade e relativamente rápida, a FISH é uma ferramenta muito útil no diagnóstico para os laboratórios de citogenética (Mundle e Sokolova, 2004).

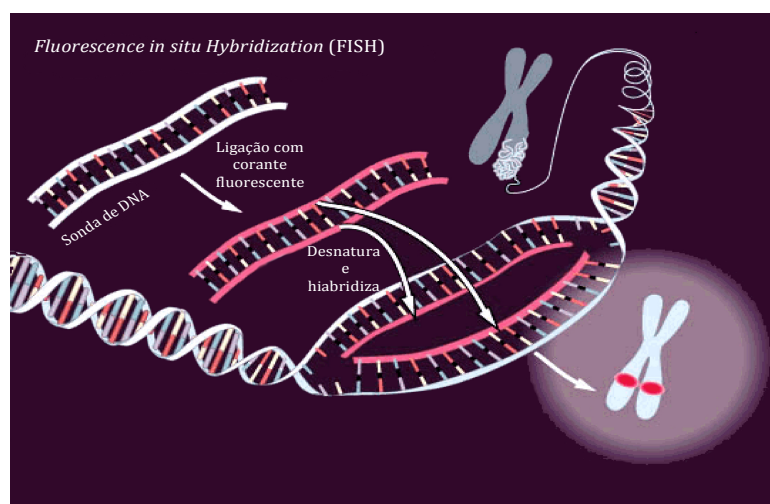


Figura 8 – Representação esquemática da técnica de FISH. A sonda de DNA é marcado com um fluorocromo. A sonda e o DNA alvo são desnaturalizados, e a sonda depois hibridiza com o alvo, de modo a ser detectado recorrendo ao microscópio de fluorescência (adaptado de www.genome.gov).

1.2.3. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A técnica de MLPA foi introduzida pela MRC-Holland em 2002 e baseia-se numa reacção de *PCR* (*polymerase chain reaction*) que permite avaliar, em simultâneo até 48 *loci* diferentes (figura 9). A técnica de genética molecular MLPA é referenciada como tendo uma maior resolução e especificidade que a técnica de FISH permitindo estudar em pormenor a região crítica de um determinado cromossoma e esclarecer a sua influência na etiologia dos diversos traços fenotípicos associados a uma determinada patologia (Sellner *et al.*, 2004).

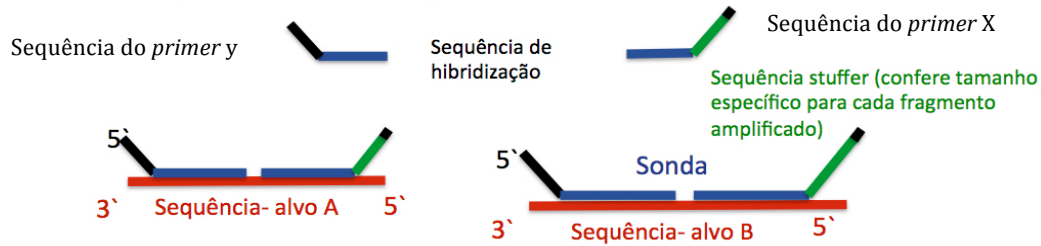
A técnica de MLPA tem como principais vantagens distinguir sequências que diferem em apenas um único nucleotídeo com elevada sensibilidade, pois necessita de pequenas quantidades de DNA (apenas 20 ng de DNA). No entanto, esta técnica apresenta também algumas limitações a ter em consideração, nomeadamente, o desenvolvimento das sondas é bastante complexo, havendo no entanto, já painéis disponíveis para diagnóstico (Jalali, 2008). Porém, o MLPA é consideravelmente menos dispendioso quando comparado com métodos como a FISH e o *array*-CGH (*array-comparative genomic hybridization*) (Cai *et al.*, 2008).

Comparando com a técnica FISH, as sequências detectadas são bastante mais pequenas (aproximadamente 60 nucleotídeos). Em relação a outras técnicas, em geral, as reacções MLPA são mais rápidas, mais baratas e mais simples (Jalali, 2008).

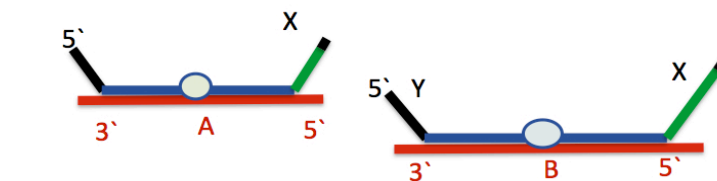
Deste modo, esta metodologia deve ser usada conjuntamente com a citogenética convencional e outras técnicas moleculares, como por exemplo, *array*-CGH (Slater *et al.*, 2003; Hochstenbach *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que o MLPA pode ser uma ferramenta útil para avaliar clinicamente microdeleções e microduplicações cromossómicas relevantes em PEA (Cai *et al.*, 2008; Depienne *et al.*, 2009). Com um múltiplo painel de sondas para MLPA, os diagnósticos clínicos genéticos podem agora ser realizados em mais de 10% dos casos de PEA (Cai *et al.*, 2008).

1. Desnaturação & 2. Hibridização



3. Ligação

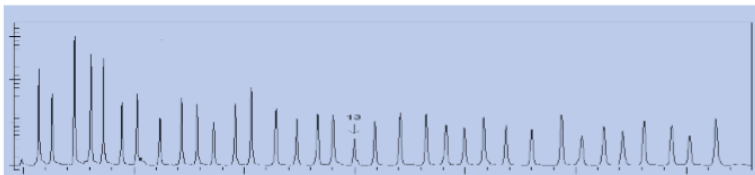


As duas partes de cada sonda hibridizam com as sequências alvo adjacentes e são ligadas por uma ligase termoestável.

4. PCR: todos os produtos das ligações são amplificadas por PCR usando apenas um par de primers



5. Separação dos produtos por eletroforese capilar



6. Análise de Resultados

- Programa de análise estatística: **Coffalyser**

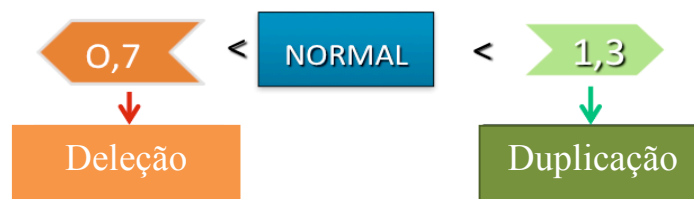


Figura 9 - Descrição geral das etapas envolvidas na reação de MLPA. Esta técnica baseia-se na identificação das sequências alvo através da hibridização de duas sondas de MLPA, que são posteriormente ligadas entre si. As sondas hibridizadas são depois amplificadas por uma reação de PCR, usando um par de primers. Para obter os valores finais para análise de cada região-alvo, é calculado o rácio que corresponde à amostra (número de cópias) a dividir sobre a média dos controlos (número de cópias) (adaptado de Schouten *et al.*, 2002 e de www.mlpa.com).

1.2.4. *Array comparative genomic hybridization (array-CGH)*

A técnica de baseia-se na hibridização competitiva de dois genomas (um teste e um controlo, marcados com diferentes fluorocromos). Desvios na intensidade relativa de fluorescência dos dois fluorocromos em determinadas regiões cromossómicas indicam variação no número de cópias dessa região (figura 10). O *array-CGH* combina os princípios do CGH tradicional com os *microarrays* de DNA. Fragmentos de DNA representativos das zonas de interesse, *BACs* (*bacterial artificial chromosome*), Oligonucleótidos ou *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*), são fixados numa lâmina de vidro de forma ordenada, criando uma matriz. Os DNA controlo e teste são marcados diferencialmente e hibridizados competitivamente contra a matriz seleccionada. Os desvios na intensidade relativa dos fluorocromos são detectados por um scanner e indicam perda ou ganho de material. O tratamento dos dados é feito informaticamente.

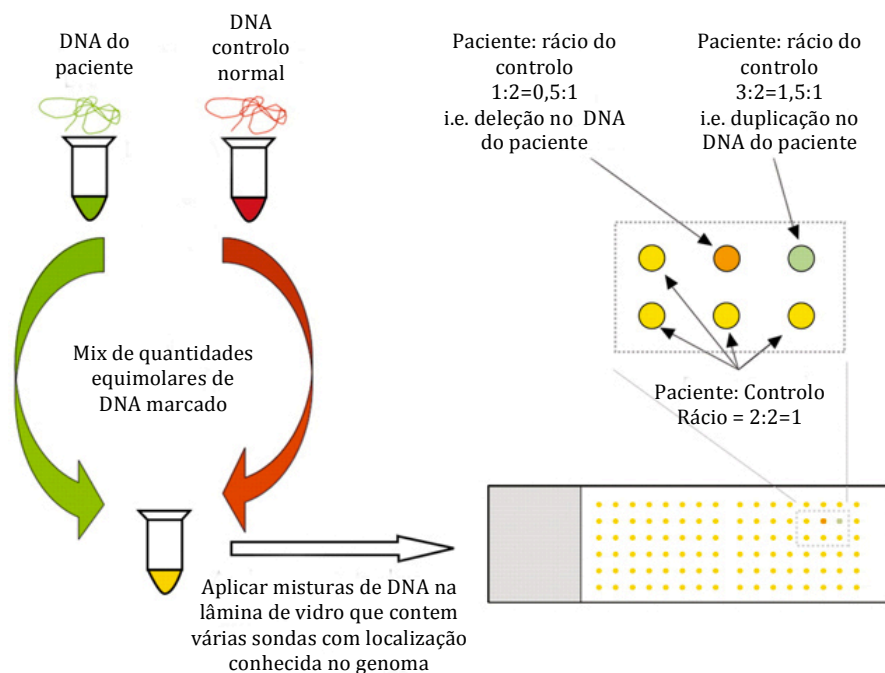


Figura 10 – Representação esquemática da técnica de array-CGH (adaptado de Sharkey *et al.*, 2005).

A resolução do *array*-CGH é determinada pelo número e tamanho dos fragmentos usados na matriz e pela distância que os separa no genoma. A grande vantagem do CGH é poder detectar simultaneamente, num só ensaio, aneuploidias, deleções, duplicações, amplificações de qualquer *locus* representado no *array*, incluindo zonas intersticiais que não são cobertas por métodos mais dirigidos como a FISH ou o MLPA.

O *array*-CGH tem vindo a difundir-se gradualmente graças à versatilidade e abrangência de estudos que permite, existindo já diversas soluções comerciais. Uma desvantagem é não detectar alterações estruturais equilibradas (Flint e Knight, 2003).

A maior desvantagem é a necessidade de um investimento considerável, principal obstáculo à sua generalização na rotina.

1.3. Objectivos

Os objectivos deste trabalho são:

- avaliar a eficácia da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas P343, específico para o autismo, no diagnóstico laboratorial
- relacionar o espectro do autismo com a frequência de alterações cromossómicas em regiões alvo (15q11-q13, 16p11.2 e 22q13) através da técnica de MLPA;
- estabelecer uma correlação entre o genótipo e fenótipo nos indivíduos com autismo em que foram encontradas alterações cromossómicas.

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupo de estudo

O laboratório de Citogenética e Genómica recebeu de 2001 a 2010, 554 casos de autismo.

Neste estudo foram incluídas 25 amostras de sangue periférico de pacientes selecionados com quadros específicos de autismo e referenciados pela consulta de desenvolvimento e autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra (tabela 1). Foram incluídas no estudo três controlos de indivíduos normais para as regiões de pesquisar e uma amostra de um controlo positivo com uma anomalia conhecida.

Tabela 1 - Informação dos pacientes incluídos no estudo, todos referenciados com manifestações do especto de autismo.

Paciente	Idade (anos)	Género	Informação Clínica
1	2	♂	Autismo
2	5	♂	Espectro de autismo
3	4	♂	Autismo
4	4	♂	Autismo
5	3	♂	Autismo
6	4	♂	Autismo
7	3	♂	Autismo
8	10	♂	Autismo
9	5	♀	Défice cognitivo, epilepsia, características de autismo
10	4	♂	Autismo
11	5	♂	Autismo
12	2	♂	Autismo
13	7	♂	Autismo, face sugestivo de Síndrome de Sotos
14	7	♂	Défice de atenção, autismo
15	14	♂	Autismo
16	15	♀	Autismo, défice cognitivo e epilepsia

Tabela 1 - Informação dos pacientes incluídos no estudo, todos referenciados com manifestações do espectro de autismo (Continuação).

17	7	♀	Autismo
18	10	♂	Síndrome de Asperger - autismo
19	5	♂	Autismo sem défice cognitivo
20	3	♂	Autismo clássico
21	6	♂	Autismo
22	5	♂	Autismo
23	5	♂	Autismo
24	3	♂	Autismo
25	3	♂	Autismo

2.2. Citogenética convencional

Todos os pacientes foram estudados por citogenética convencional, a análise foi realizada em metáfases com bandas GTG e um nível de resolução de 500 a 700 bandas, obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico pelos procedimentos de rotina do laboratório.

2.3. *Multiplex ligation dependent-Probe Amplification (MLPA)*

Para se proceder a reacção de MLPA, foi feito previamente a extracção de DNA a partir de amostras de sangue em EDTA dos pacientes em estudo. Os produtos de extracção foram avaliados no *Nanodrop 1000 (thermo scientific Wilmington, United States of American)* quanto à concentração em DNA e pureza.

2.3.1. Extracção de DNA

Existem três passos básicos neste processo de extracção do DNA genómico a partir de qualquer tecido: a lise das membranas celular e nuclear, a degradação das proteínas e a precipitação do DNA.

A extracção de DNA efectuou-se a partir de linfócitos de sangue periférico, colhido em tubo de EDTA, seguindo a metodologia de acordo com as instruções do fabricante (*JETQUICK Blood Midi Spin, Genomed*).

2.3.2. Determinação da concentração de DNA e grau de pureza

O DNA extraído de cada paciente foi quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop. Para além da concentração de DNA, verificou-se também a pureza das amostras, principalmente através da medição da absorvância a 260 nm (correspondente aos ácidos nucleicos) e de absorvância a 280 nm (correspondente à quantidade de proteínas). O valor da razão entre as duas absorvâncias (A260/A280) traduz o grau de pureza, considerado óptimo entre 1,80-2,00.

2.3.3. Reacção de MLPA

As amostras de DNA dos pacientes foram analisados recorrendo ao painel de sondas SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1 (lote 0109), da *MRC-Holland* (Amsterdão, Holanda) (tabela 2). Foram usados três controlos normais para as regiões alvo, uma amostra como controlo positivo e um controlo negativo (sem DNA). O protocolo utilizado foi de acordo com o fornecido pelo fabricante (*MRC-Holland*), e utilizado no laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

O painel de sondas, é acompanhado dos reagentes necessários para usar em 100 amostras: *SALSA probemix* (único que difere entre os painéis de sondas), *SALSA MLPA buffer*, *Ligase-65*, *Ligase-65 Buffer A*, *Ligase-65 Buffer B*, *SALSA PCR buffer*, *SALSA PCR Primer mix* (mistura de primers + dNTPs), *SALSA Polymerase*, *SALSA Enzyme dilution buffer*. Os reagentes foram armazenados a -20°C e protegidos da luz.

O painel utilizado, SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1, contém várias sondas direccionadas para os genes alvo nos cromossomas 15q, 16p e 22q e outras sequências controlo (tabela 2).

Tabela 2 - Sondas utilizadas e genes estudados incluídos no painel SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1.

Comprimento (nt)	Genes/Sondas	Refência	Posição do cromossoma		
			15q11-q13 / exão	16p11	SHANK3
136	ATP10A probe 12964-L14669		15q12	Exon 1	
142	UBE3A probe 10883-L11553		15q11	Exon 9	
148	GABRB3 probe 10872-L11542		15q12	Exon 7	
154	Reference probe 09431-L09680	11q13			
160	UBE3A probe 04620-L14668		15q11	Exon 7	
166	KLFL3 probe 08376-L08230		15q13	Exon 2	
172	HIRIP3 probe 11667-L14670			Exon 3	
178	NDNL2 probe 08377-L08231		15q13	Exon 1	
184	GABRB3 probe 10868-L11538		15q12	Exon 5	
190	Reference probe 09979-L10438	19p13			
197	UBE3A probe 10880-L11550		15q11	Exon 6	
202	APBA2 probe 01314-L00867		15q12	Exon 14	
208	SEZ6L2 probe 11668-L12439			Exon 1	
214	SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906		15q11		
220	GABRB3 probe 01315-L09339		15q12	Exon 10	
226	DOC2A probe 13162-L12447			Exon 4	
232	SHANK3 probe 06787-L07383				Exon 22
238	MAZ probe 11669-L12440			Exon 5	
244	UBE3A probe 10886-L14677		15q11	Exon 12	
250	Reference probe 02658-L02125	11q23			
256	UBE3A probe 01317-L00864		15q11	Exon 13	
265	Reference probe 10243-L02149	1q44			
270	ATP10A probe 11165-L12883		15q12	Exon 6	
286	CHRNA7 probe 12956-L08237		15q13	Exon 4	
292	GABRB3 probe 10875-L11545		15q12	Exon 9	
300	TJP1 probe 08389-L14671		15q13	Exon 1	
309	SHANK3 probe 06784-L06376				Exon 3
319	GABRB3 probe 10870-L11540		15q12	Exon 6	
328	Reference probe 05297-L04685	3q11			
337	CD2BP2 probe 11671-L12442			Exon 4	
346	MVP probe 00550-L00372			Exon 1	
355	GABRB3 probe 10867-L11537		15q12	Exon 4	
364	SPN probe 11672-L12443			Exon 2	
373	TRPM1 probe 08397-L14672		15q13	Exon 27	
382	GABRB3 probe 10874-L11544		15q12	Exon 8	
391 *	SHANK3 probe 14190-L15800				Exon 15
409	Reference probe 07208-L06858	7p14			
418	MAZ probe 11673-L12444			Exon 6	
427	SCG5 probe 12951-L14742		15q13	Exon 6	
436	OCA2 probe 02040-L01553		15q12	Exon 22	
445	OCA2 probe 02041-L03725		15q12	Exon 1	
454	HIRIP3 probe 11674-L12445			Exon 4	
465	MAPK3 probe 11675-L12446			Exon 5	
475	SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795		15q11		
481	LAT probe 11677-L12448			Exon 3	
492	SCG5 probe 12954-L14464		15q13	Exon 3	

A localização genómica das alterações cromossómicas encontradas foi baseada na base de dados UCSC (*University of California, Santa Cruz*) *Genome Browser on Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18)* (<http://genome.ucsc.edu>).

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados gerais

Dos 25 pacientes incluídos neste trabalho apresentavam todos estudo prévio pela citogenética convencional normal, recorreu-se depois à técnica de MLPA de modo a pesquisar os genes alvo nas regiões 15q11-q13, 16p11 e 22q13.3

A análise dos 25 pacientes através da reacção de MLPA com o painel SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1, revelou três controlos sem anomalias nas regiões estudadas, confirmou no controlo positivo a anomalia conhecida e nos outros 21 probandos revelou dois pacientes com alterações na região 15q11-q13 e um com alterações na região na região 16p11.2. Nos probandos em que foram detectadas alterações, posteriormente foram também avaliados os progenitores para as mesmas regiões avaliadas nos probandos.

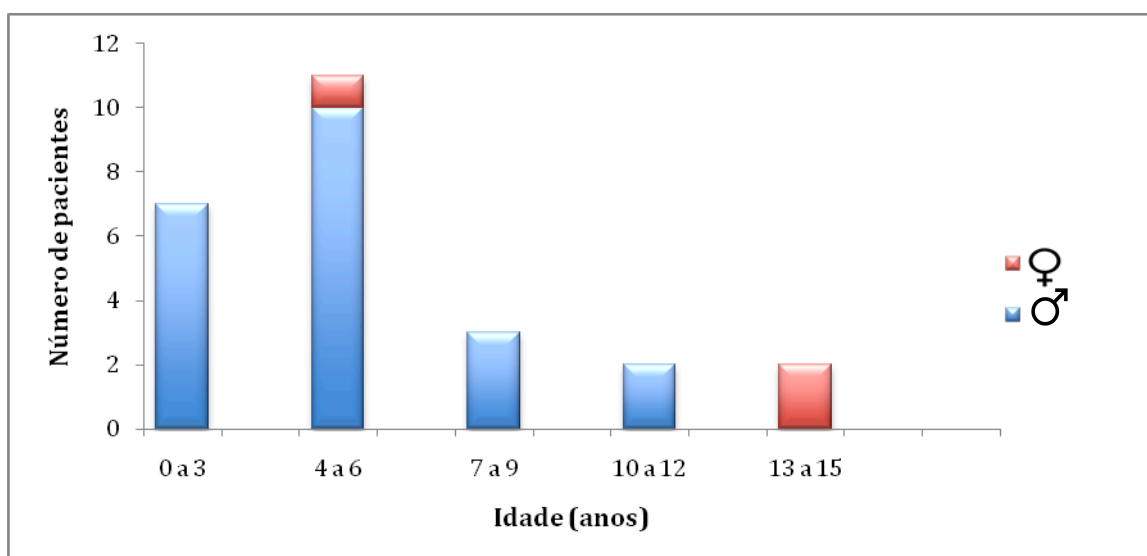


Figura 11 - Pacientes estudados distribuídos através da faixa etária e género.

As idades dos pacientes estudados variam entre os 2 e 15 anos, sendo que a maioria está na faixa dos 4 aos 6 anos. Verificou-se uma predominância de aproximadamente 7:1 entre rapazes e raparigas, respectivamente (figura 11).

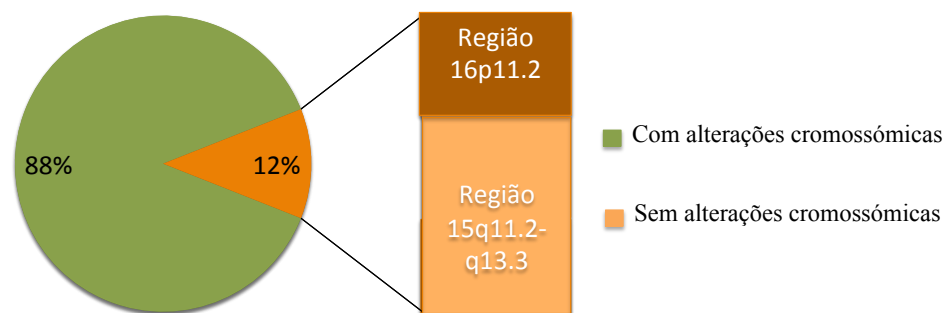


Figura 12- Incidência de alterações no grupo de estudo

Dos 25 pacientes autistas estudados pela técnica de MLPA, 3 apresentaram alterações cromossômicas, duas delas na região 15q11-q13 e uma na região 16p11.2 verificando-se que os três probandos eram do sexo masculino (figura 12 e tabela 3).

Tabela 3 - Alterações encontradas no grupo de pacientes por MLPA.

Paciente	Idade (anos)	Género	Alteração	Origem
12	2	♂	Duplicação 15q11.2-q13.1	materna
14	7	♂	Deleção 16p11.2	<i>de novo</i>
15	14	♂	Deleção 15q13.2-q13.3	paterna

Em seguida, serão discutidos os casos que apresentam anomalias cromossômicas mais detalhadamente.

3.2. Paciente 12

O paciente 12 (tabela 4) trata-se de um menino autista de 2 anos de idade, cujo irmão já tinha sido referenciado por atraso no desenvolvimento com alterações no comportamento, para estudo por MLPA, tendo sido identificada uma duplicação na região 15q11.2-q13.3. Verificou-se que o probando era também portador de uma duplicação semelhante. O tamanho da duplicação é de aproximadamente 3,17Mb (15:22,848,294-26,018,007 bp). A análise por citogenética convencional revelou um resultado normal (figura13).

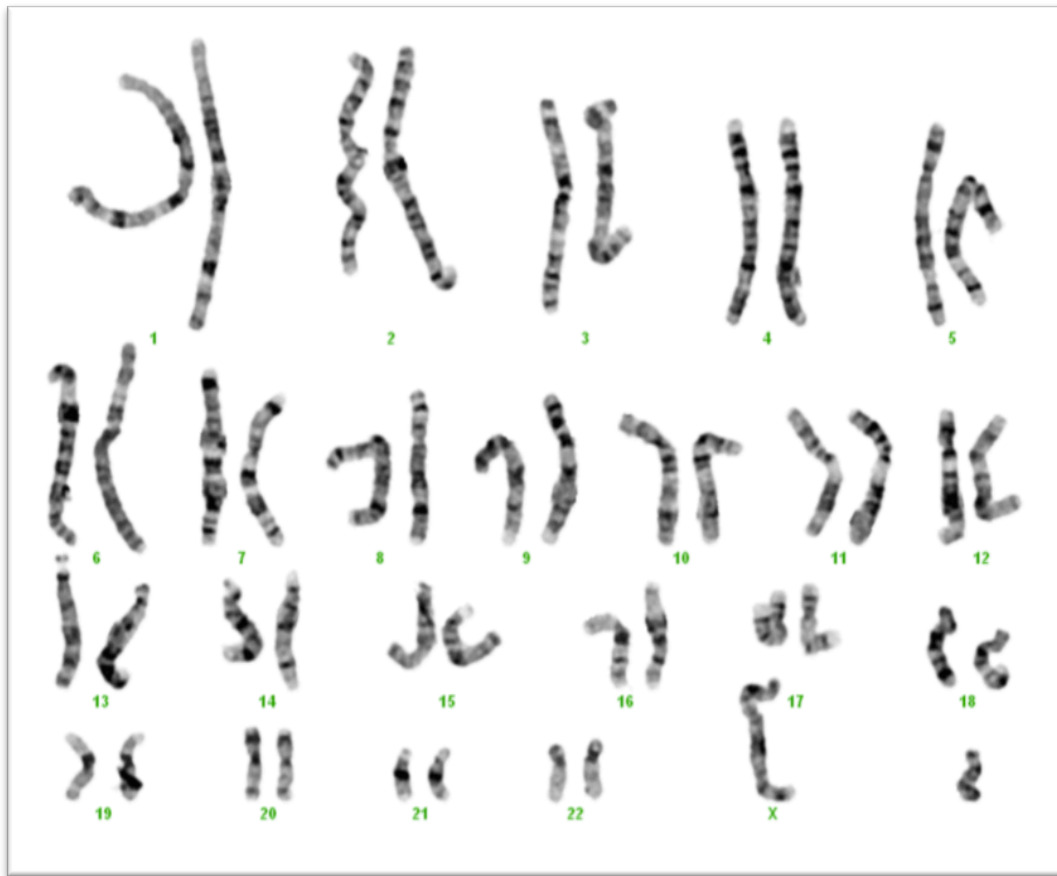


Figura 13 - Cariograma com bandas GTG de um paciente com o complemento 46,XY.

Perante a alteração no probando e irmão foi solicitada amostras de sangue periférico dos progenitores para determinar se a duplicação era uma herança paterna ou materna.

Os resultados demonstraram que a duplicação tinha sido herdada por via materna [mlpa *15q11-q13(SNRPN,UBE3A,ATP10A,GABRB3,OCA2)x3mat*] (tabela 4).

Posteriormente avaliámos a tia materna do probando uma vez que também apresentava características do espectro do autismo. A técnica de MLPA revelou que a tia também era portadora da mesma duplicação para a região do cromossoma 15q11.2-q13.1.

Tabela 4 - Resultados obtidos através da análise do Software *Coffalyser*, no paciente 12, mostrando a duplicação nos *loci* (*SNRPN-HB2-85M*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3*, *OCA2*) na região, utilizando o painel de sondas P343-B1.

Gene	Chr	pos	length (nt)	MV36	Pai	Paciente 12
SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11.2	214	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Gain (1,39)	Normal (0,72)	Gain (1,6)
SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11.2	472	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Gain (1,36)	Normal (0,86)	Gain (1,38)
UBE3A probe 01317-L00864	15q11.2	256	15-023.2 UBE3A Exon 13	Gain (1,39)	Normal (1,04)	Gain (1,45)
UBE3A probe 10886-L14677	15q11.2	244	15-023.2 UBE3A Exon 12	Gain (1,39)	Normal (1,04)	Gain (1,4)
UBE3A probe 10883-L11553	15q11.2	142	15-023.2 UBE3A Exon 09	Gain (1,44)	Normal (0,97)	Gain (1,52)
UBE3A probe 04620-L14668	15q11.2	161	15-023.2 UBE3A Exon 07	Gain (1,41)	Normal (1,02)	Gain (1,47)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	Gain (1,41)	Normal (0,97)	Gain (1,45)
ATP10A probe 11165-L12883	15q12	271	15-023.6 ATP10A Exon 06	Gain (1,43)	Normal (0,95)	Gain (1,35)
ATP10A probe 12964-L14669	15q12	137	15-023.6 ATP10A Exon 01	Gain (1,45)	Normal (1)	Gain (1,51)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3 Exon 10	Gain (1,42)	Normal (1)	Gain (1,51)
GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	292	15-024.5 GABRB3 Exon 09	Gain (1,42)	Normal (0,88)	Gain (1,45)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3 Exon 08	Gain (1,43)	Normal (0,88)	Gain (1,46)
GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	148	15-024.5 GABRB3 Exon 07	Gain (1,33)	Normal (0,93)	Gain (1,44)
GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	319	15-024.5 GABRB3 Exon 06	Gain (1,4)	Normal (0,91)	Gain (1,51)
GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	184	15-024.5 GABRB3 Exon 05	Gain (1,34)	Normal (0,96)	Gain (1,4)
GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	355	15-024.5 GABRB3 Exon 04	Gain (1,46)	Normal (0,94)	Gain (1,43)
OCA2 probe 02040-L01553	15q13.1	436	15-025.9 OCA2 Exon 22	Gain (1,47)	Normal (1,01)	Gain (1,42)
OCA2 probe 02041-L03725	15q13.1	445	15-025.9 OCA2 Exon 01	Gain (1,44)	Normal (1,03)	Gain (1,48)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	Normal (0,9)	Normal (1,1)	Normal (0,94)
NDNL2 probe 08377-L08231	15q13.1	178	15-027.3 NDNL2	Normal (0,94)	Normal (1,05)	Normal (1,03)
TJP1 probe 08399-L08253	15q13.1	391	15-027.8 TJP1 Exon 27	Normal (0,94)	Normal (0,94)	Normal (0,96)
TJP1 probe 08389-L14671	15q13.1	300	15-027.8 TJP1 Exon 01	Normal (0,98)	Normal (1,01)	Normal (0,99)
MTMR15 probe S0356-L13236	15q13.2	119	15-029.0 MTMR15 Exon 14	Normal (1,02)	Normal (0,87)	Normal (1)
MTMR15 probe S0357-L13235	15q13.2	114	15-029.0 MTMR15 Exon 15	Normal (0,9)	Normal (0,94)	Normal (0,9)
TRPM1 probe 08397-L14672	15q13.2	374	15-029.1 TRPM1	Normal (0,94)	Normal (0,99)	Normal (1,01)
KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	166	15-029.4 KLF13	Normal (0,93)	Normal (1,03)	Normal (0,97)
CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13.3	286	15-030.2 CHRNA7	Normal (1)	Normal (1,04)	Normal (1,01)
SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	493	15-030.7 SCG5 Exon 03	Normal (0,98)	Normal (0,99)	Normal (0,97)
SCG5 probe 12951-L14742	15q13.3	426	15-030.7 SCG5 Exon 06	Normal (0,88)	Normal (0,94)	Normal (0,9)
LAT probe 11677-L12448	16p11.2	481	16-028.9 LAT	Normal (1,01)	Normal (1,07)	Normal (0,96)
SPN probe 11672-L12443	16p11.2	364	16-029.6 SPN	Normal (0,91)	Normal (1,11)	Normal (0,91)
MAZ probe 11669-L12440	16p11.2	238	16-029.7 MAZ	Normal (0,94)	Normal (1,11)	Normal (0,96)
MAZ probe 11673-L12444	16p11.2	418	16-029.7 MAZ	Normal (1,02)	Normal (1,01)	Normal (1,03)
MVP probe 00500-L00372	16p11.2	346	16-029.7 MVP	Normal (0,97)	Normal (1,04)	Normal (0,95)
SEZ6L2 probe 11668-L12439	16p11.2	208	16-029.8 SEZ6L2	Normal (1,02)	Normal (1,1)	Normal (1)
HIRIP3 probe 11674-L12445	16p11.2	454	16-029.9 HIRIP3	Normal (0,98)	Normal (1,02)	Normal (0,89)
HIRIP3 probe 11667-L14670	16p11.2	173	16-029.9 HIRIP3	Normal (0,95)	Normal (1,03)	Normal (1,04)
DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	226	16-029.9 DOC2A	Normal (0,96)	Normal (1,04)	Normal (0,91)
MAPK3 probe 11675-L12446	16p11.2	463	16-030.0 MAPK3	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,04)
CD2BP2 probe 11671-L12442	16p11.2	337	16-030.3 CD2BP2	Normal (0,93)	Normal (1,06)	Normal (0,97)
SHANK3 probe 06784-L06376	22q13.33	310	22-049.5 SHANK3 Exon 03	Normal (1)	Normal (1,07)	Normal (0,97)
SHANK3 probe 06785-L06377	22q13.33	400	22-049.5 SHANK3 Exon 10	Normal (0,92)	Normal (0,97)	Normal (0,96)
SHANK3 probe 06787-L07383	22q13.33	232	22-049.5 SHANK3 Exon 22	Normal (0,96)	Normal (1)	Normal (0,95)
Reference probe 10243-L02149	01q44	264	c	Normal (0,97)	Normal (0,91)	Normal (0,99)
Reference probe 05297-L04685	03q11	328	c	Normal (0,93)	Normal (0,89)	Normal (0,96)
Reference probe 07208-L06858	07p14	409	c	Normal (0,9)	Normal (0,99)	Normal (0,95)
Reference probe 10218-L14675	07q22	500	c	Normal (0,96)	Normal (0,92)	Normal (1,04)
Reference probe 09431-L09680	11q13	154	c	Normal (0,96)	Normal (0,99)	Normal (1)
Reference probe 02658-L02125	11q23	250	c	Normal (0,96)	Normal (0,97)	Normal (0,99)
Reference probe 09727-L10077	12q24	130	c	Normal (1)	Normal (0,95)	Normal (1,03)
Reference probe 09176-L09350	17q11	124	c	Normal (0,98)	Normal (1,06)	Normal (0,97)
Reference probe 09979-L10438	19p13	190	c	Normal (0,96)	Normal (0,99)	Normal (0,94)

Embora o probando, a mãe, o irmão e a tia sejam portadores da mesma anomalia, (dup 15q11.2-q13.1), o seu fenótipo é variável. Apenas o probando e a tia foram diagnosticados como autistas, o irmão apresenta atraso no desenvolvimento com alterações no comportamento e a mãe apresenta alterações do comportamento, mas tem um fenótipo mais ligeiro com déficit cognitivo, sendo no entanto capaz de desempenhar a sua rotina sem dificuldades (figura 14). Pacientes com duplicações intersticiais na região dos Síndromes Prader-wili e Angelman com fenótipos anormais têm sido reportados na literatura com atraso no desenvolvimento, problemas de linguagem, déficit cognitivo, dificuldades de coordenação motora e autismo (Bolton *et al.*, 2001; Depienne, *et al.*, 2009).

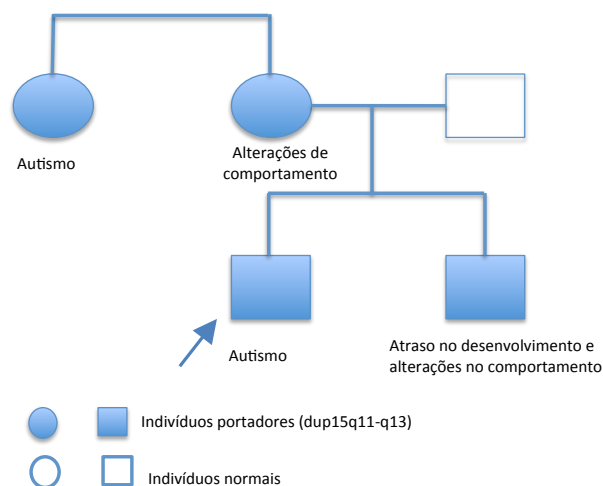


Figura 14 – Heredograma da família do paciente 12 com a descrição fenotípica.

Devido à expressão fenotípica ser variável, pode-se sugerir que os mecanismos epigenéticos poderão desempenhar, neste caso, um papel preponderante e estejam na base fisiopatológica dos diferentes fenótipos apresentados.

A análise dos efeitos da origem parental nos genes candidatos, bem como o potencial das interações gene-ambiente, podem explicar algumas das enigmáticas características genéticas do autismo e da variabilidade fenotípica das perturbações do neurodesenvolvimento. A existência de portadores de anomalias cromossômicas que manifestam fenótipos tão variáveis como os evidenciados nesta família, sugerem que os mecanismos epigenéticos condicionam a manifestação de patologias do neurodesenvolvimento, devido à sua ação nos complexos sistemas biológicos (Schanen, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

A expressão dos genes desta região é regulada por mecanismos de *imprinting*, uma vez que apenas as alterações cromossômicas 15q11-q13 herdadas da mãe parecem patogênicas (Bolton *et al.*, 2001; Dittrich *et al.*, 1996; Mohandas *et al.*, 1999).

Segundo Repetto, como a maior parte das duplicações são de origem materna, é provável que este rearranjo resultante de um *crossing-over* desigual seja mais comum na meiose feminina (Repetto, 2001).

A duplicação 15q11.2 apresenta um tamanho de aproximadamente 3,17 Mb, no entanto poderá ser maior, visto que a primeira sonda normal, gene *APBA2*, localizada a jusante da última sonda duplicada, gene *OCA2*, dista 1,18 Mb. Não há sondas para genes a montante de *SNRPN* (figura 15).

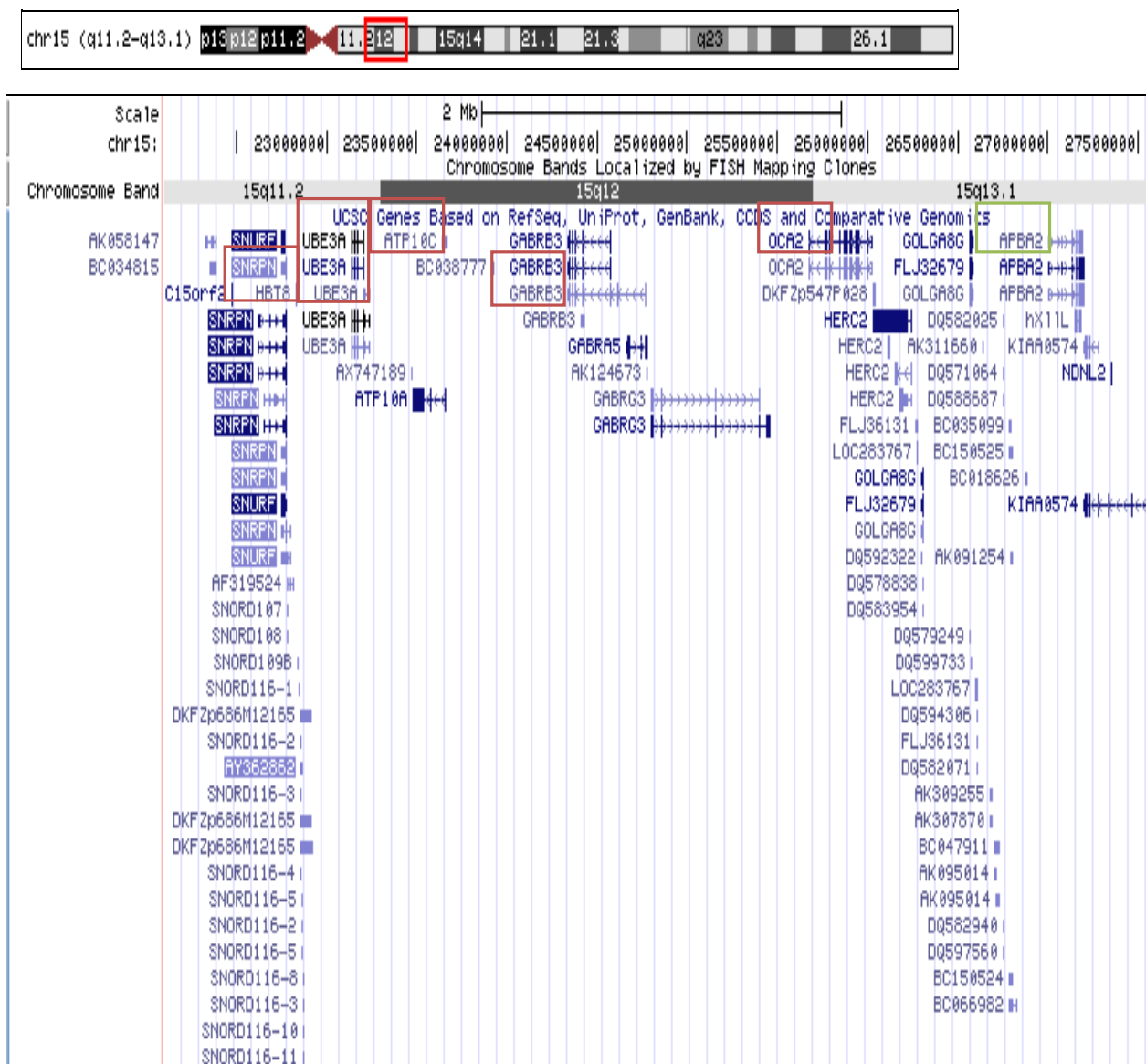


Figura 15 - Representação esquemática da região duplicada no paciente 12 e a sua localização no cromossoma 15. Os retângulos vermelhos representam os genes duplicados, enquanto os rectângulos a verde representam os genes que estão a jusante da duplicação e presentes no painel de sondas específico para o autismo (imagem adaptada da base de dados genómica UCSC, March 2006, <http://genome.ucsc.edu>).

As duplicações na região 15q11-q13 têm sido reportadas em pacientes autistas em vários estudos (figura 16).

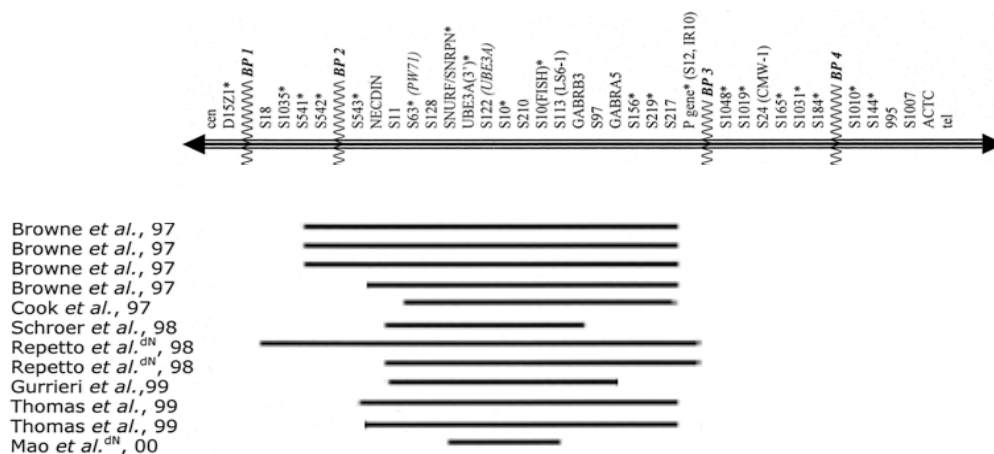


Figura 16 – Representação esquemática de duplicações 15q herdadas por via materna, de pacientes reportados nos estudos apresentados na figura (adaptado de Boyar *et al.*, 2001).

A região duplicada envolve vários genes entre eles estão os genes *UBE3A* e *ATP10A* que são expressos da cópia materna do cromossoma 15, e o processo de *imprinting* que regula a sua actividade é mais importante no cérebro. Nos outros tecidos estão activos tanto os genes de origem materna como paterna (Kim *et al.*, 2002). O gene *UBE3A* codifica a enzima ubiquitina-proteína-ligase E3A envolvida na degradação de proteínas, sendo indispensável para o normal funcionamento celular. A ausência da proteína causa o Síndrome de Angelman, sendo apenas a cópia deste gene de origem materna que se expressa nas células nervosas (Nurmi *et al.*, 2001). O gene *ATP10A* codifica uma proteína que se julga estar envolvida no movimento do cálcio nas células (Nurmi *et al.*, 2001).

Os genes do receptor 3 do GABA estão duplicados nesta região. O GABA é um importante neurotransmissor com funções inibitórias celulares desempenhando um importante papel em praticamente todas as funções cerebrais. Nos murganhos, a expressão diminuída ou sobreexpressão de sub-unidades de receptores GABA provoca convulsões, sendo provável que alterações a este nível possam predeterminar crianças com duplicação 15q11-q13 para epilepsia e outras disfunções cerebrais (Menold *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005).

3.3. Paciente 14

O paciente 14 é um menino de 7 anos que tem como diagnóstico clínico autismo com déficit de atenção. O menino apresentava um cariótipo normal, no entanto, através de MLPA verificou-se que apresentava uma deleção no braço curto do cromossoma 16, mais concretamente em 16p11.2 (tabela 5). O tamanho da deleção é de aproximadamente 453, 70 Kb (16:29,582,828-30,036,531).

Tabela 5- Resultados obtidos através da análise do Software *Coffalyser* no paciente 14, com deleção dos *loci* (*SPN,MAZ,MVP,SEZ6L2,HIRIP3,DOC2A,MAPK3*) na região 16p11.2, utilizando o painel de sondas P343-B1.Mãe

Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Paciente 14	Mãe	Pai
SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11.2	214	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Normal (0.92)	Normal (1.02)	Normal (0.91)
SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11.2	472	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Normal (0.92)	Normal (1.01)	Normal (0.99)
UBE3A probe 01317-L00864	15q11.2	256	15-023.2 UBE3A Exon 13	Normal (1.08)	Normal (0.97)	Normal (1.05)
UBE3A probe 10886-L14677	15q11.2	244	15-023.2 UBE3A Exon 12	Normal (0.94)	Normal (1.02)	Normal (1.06)
UBE3A probe 10883-L11553	15q11.2	142	15-023.2 UBE3A Exon 09	Normal (1.06)	Normal (0.96)	Normal (0.99)
UBE3A probe 04620-L14668	15q11.2	161	15-023.2 UBE3A Exon 07	Normal (1.03)	Normal (0.94)	Normal (1.01)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	Normal (1.11)	Normal (0.99)	Normal (0.95)
ATP10A probe 11165-L12883	15q12	271	15-023.6 ATP10A Exon 06	Normal (0.99)	Normal (1)	Normal (0.96)
ATP10A probe 12964-L14669	15q12	137	15-023.6 ATP10A Exon 01	Normal (0.86)	Normal (0.98)	Normal (1.05)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3 Exon 10	Normal (0.91)	Normal (1.01)	Normal (1.01)
GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	292	15-024.5 GABRB3 Exon 09	Normal (1.1)	Normal (1.01)	Normal (0.99)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3 Exon 08	Normal (1.09)	Normal (0.98)	Normal (0.99)
GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	148	15-024.5 GABRB3 Exon 07	Normal (0.9)	Normal (0.94)	Normal (0.99)
GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	319	15-024.5 GABRB3 Exon 06	Normal (1.01)	Normal (0.94)	Normal (1.01)
GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	184	15-024.5 GABRB3 Exon 05	Normal (0.88)	Normal (0.94)	Normal (1.01)
GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	355	15-024.5 GABRB3 Exon 04	Normal (0.97)	Normal (1.01)	Normal (1)
OCA2 probe 02040-L01553	15q13.1	436	15-025.9 OCA2 Exon 22	Normal (0.88)	Normal (1.03)	Normal (0.99)
OCA2 probe 02041-L03725	15q13.1	445	15-025.9 OCA2 Exon 01	Normal (0.97)	Normal (1.06)	Normal (1.02)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	Normal (0.86)	Normal (0.99)	Normal (1.02)
NDNL2 probe 08377-L08231	15q13.1	178	15-027.3 NDNL2	Normal (0.97)	Normal (0.96)	Normal (1.03)
TJP1 probe 08399-L08253	15q13.1	391	15-027.8 TJP1 Exon 27	Normal (0.93)	Normal (1.06)	Normal (0.98)
TJP1 probe 08389-L14671	15q13.1	300	15-027.8 TJP1 Exon 01	Normal (0.91)	Normal (0.99)	Normal (1.07)
MTMR15 probe S0355-L13236	15q13.2	119	15-029.0 MTMR15 Exon 14	Normal (1)	Normal (1.01)	Normal (0.94)
MTMR15 probe S0357-L13235	15q13.2	114	15-029.0 MTMR15 Exon 15	Normal (1.05)	Normal (1.03)	Normal (0.95)
TRPM1 probe 08397-L14672	15q13.2	374	15-029.1 TRPM1	Normal (0.92)	Normal (1.02)	Normal (1.02)
KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	166	15-029.4 KLF13	Normal (0.9)	Normal (0.96)	Normal (0.97)
CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13.3	286	15-030.2 CHRNA7	Normal (0.95)	Normal (0.96)	Normal (1.02)
SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	493	15-030.7 SCG5 Exon 03	Normal (0.88)	Normal (0.97)	Normal (0.99)
SCG5 probe 12951-L14742	15q13.3	426	15-030.7 SCG5 Exon 06	Normal (0.98)	Normal (1)	Normal (1.06)
LAT probe 11677-L12448	16p11.2	481	16-029.9 LAT	Normal (0.98)	Normal (1)	Normal (0.95)
SPN probe 11672-L12443	16p11.2	364	16-029.6 SPN	LOH (0.45)	Normal (0.91)	Normal (0.98)
MAZ probe 11669-L12440	16p11.2	238	16-029.7 MAZ	LOH (0.44)	Normal (1)	Normal (1.03)
MAZ probe 11673-L12444	16p11.2	418	16-029.7 MAZ	LOH (0.44)	Normal (1.03)	Normal (0.94)
MVP probe 00550-L00372	16p11.2	346	16-029.7 MVP	LOH (0.45)	Normal (1.04)	Normal (0.96)
SEZ6L2 probe 11668-L12439	16p11.2	208	16-029.8 SEZ6L2	LOH (0.47)	Normal (0.99)	Normal (0.99)
HIRIP3 probe 11674-L12445	16p11.2	454	16-029.9 HIRIP3	LOH (0.44)	Normal (1.02)	Normal (1)
HIRIP3 probe 11667-L14670	16p11.2	173	16-029.9 HIRIP3	LOH (0.45)	Normal (0.98)	Normal (0.97)
DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	226	16-029.9 DOC2A	LOH (0.44)	Normal (1.02)	Normal (1.09)
MAPK3 probe 11675-L12446	16p11.2	463	16-030.0 MAPK3	LOH (0.45)	Normal (0.97)	Normal (0.98)
CD2BP2 probe 11671-L12442	16p11.2	337	16-030.3 CD2BP2	Normal (0.95)	Normal (0.95)	Normal (0.95)
SHANK3 probe 06784-L06376	22q13.33	310	22-049.5 SHANK3 Exon 03	Normal (0.87)	Normal (1.02)	Normal (1.05)
SHANK3 probe 06785-L06377	22q13.33	400	22-049.5 SHANK3 Exon 10	Normal (0.96)	Normal (0.98)	Normal (0.99)
SHANK3 probe 06787-L07383	22q13.33	232	22-049.5 SHANK3 Exon 22	Normal (0.9)	Normal (1.04)	Normal (1.05)
Reference probe 10243-L02149	01q44	264	c	Normal (1.17)	Normal (0.98)	Normal (0.99)
Reference probe 05297-L04685	03q11	328	c	Normal (1.02)	Normal (0.97)	Normal (0.98)
Reference probe 07208-L06858	07p14	409	c	Normal (0.95)	Normal (1.03)	Normal (1.05)
Reference probe 10218-L14675	07q22	500	c	Normal (1.01)	Normal (0.95)	Normal (0.99)
Reference probe 09431-L09680	11q13	154	c	Normal (1.07)	Normal (1.01)	Normal (1.01)
Reference probe 02658-L02125	11q23	250	c	Normal (0.98)	Normal (1)	Normal (1)
Reference probe 09727-L10077	12q24	130	c	Normal (0.93)	Normal (1)	Normal (1.03)
Reference probe 09176-L09350	17q11	124	c	Normal (1)	Normal (0.99)	Normal (0.99)
Reference probe 09979-L10438	19p13	190	c	Normal (0.97)	Normal (1)	Normal (1)

Perante a alteração no probando foram solicitadas amostras de sangue periférico dos progenitores para determinar se a deleção era herdada ou *de novo*.

As amostras foram analisadas pela técnica de MLPA e os resultados demonstraram que nenhum dos progenitores era portador da alteração na região 16p11.2, sendo portanto um rearranjo *de novo* [mlpa 16p11.2(*SPN,MAZ,MVP,SEZ6L2,HIRIP3,DOC2A,MAPK3*)x1dn].

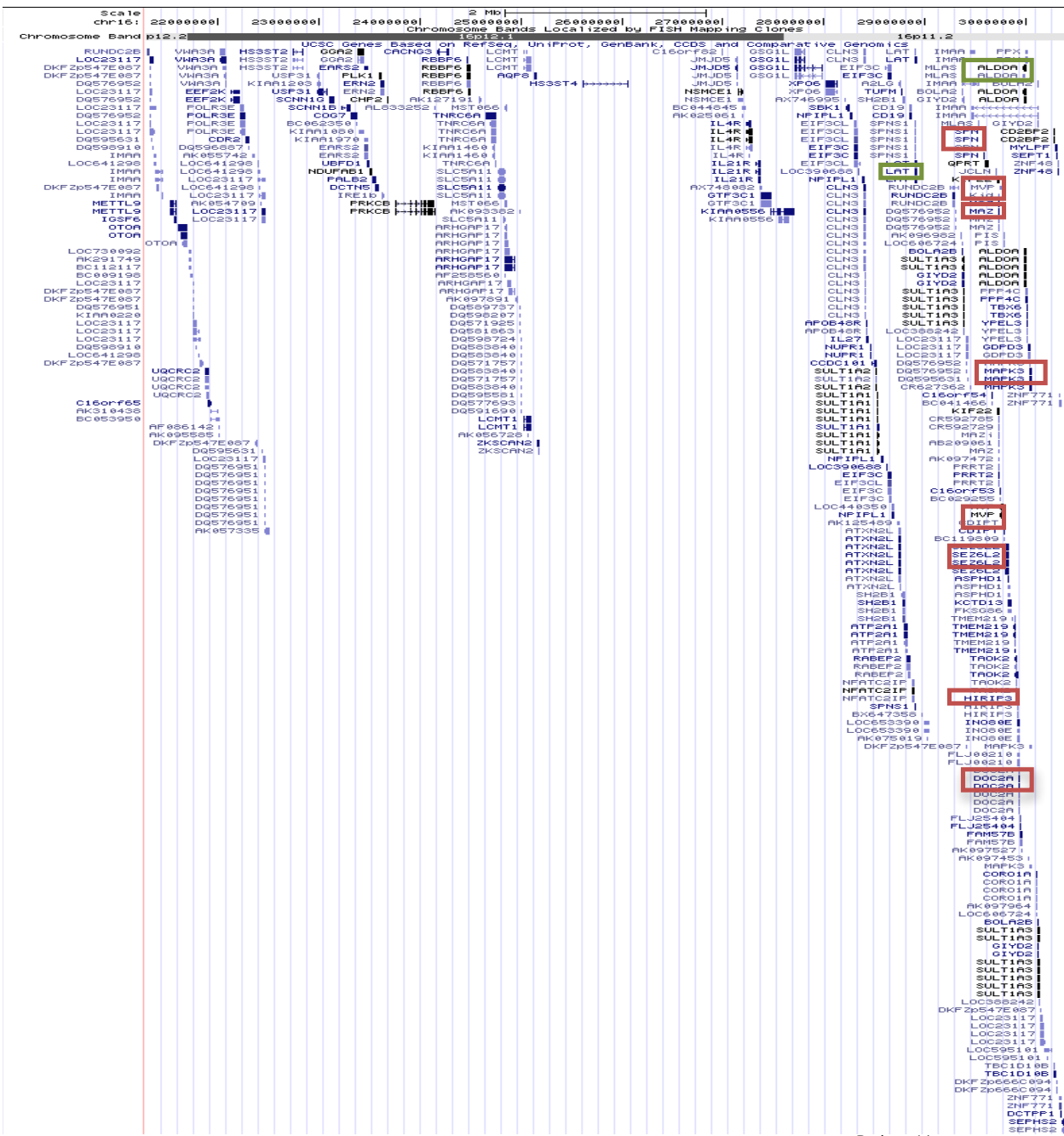
A deleção em 16p11.2 tem uma dimensão de 453,70 Kb. No entanto a deleção poderá ser maior visto que as sondas para os genes próximos da deleção, distam 678,10 Kb (distância das sondas para *SPN* e *LAT*) a montante e 236,24 Kb (distância das sondas para *MAPK3* e *CD2BP2*) a jusante.

Kumar e colaboradores, sugeriram que a microdeleção 16p11.2 está mais associada com o espectro de autismo do que com o défice cognitivo (Kumar *et al.*, 2008). Porém, para Bijlsma e colaboradores a microdeleção nem sempre manifesta perturbações do espectro de autista, estando reportados distúrbios do desenvolvimento e da fala, sem diagnóstico de autismo. A variabilidade fenotípica dos pacientes portadores da deleção 16p11.2 demonstra que por si só não causa PEA, tendo esta microdeleção sido encontrada também em indivíduos com fenótipo normal (Bijlsma, 2009). O fenótipo desta microdeleção 16p11.2 não se restringe ao espectro do autismo.

Porém, a região 16p11.2, tem-se tornado alvo de investigação em pacientes autistas, havendo vários estudos que a apontam como estando fortemente associada a esta patologia. A deleção da região 16p11.2 nem sempre é herdada, por vezes ocorre pela primeira vez na criança, sendo *de novo* (Kumar *et al.*, 2008; Weiss *et al.* 2008; Bijlsma, 2009).

Num estudo islandês com pacientes com desordens psiquiátricas ou de linguagem, a deleção 16p11.2 foi encontrada numa frequência maior do que na população controlo, 0,1% vs 0,01% (Weiss *et al.* 2008). Bijlsma e colaboradores relataram que cinco dos casos *index* num grupo 14 estavam acima do peso, assim como quatro em cada dez casos de autismo (Marshall *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2007; Bijlsma, 2009). Vários estudos sobre o autismo apoiam a patogénicidade para esta microdeleção sendo quase sempre um rearranjo *de novo* e tendo sido observada em apenas 2 dos 18.900 controlos islandeses que não tinham sido seleccionados para o estudo de desordens psiquiátricos ou de linguagem (Kumar *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2008; Sebat *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2007).

Kumar e colaboradores detetaram a deleção em quatro de 712 pacientes autistas e nenhuma nos 837 controlos (Kumar *et al.*, 2008). Da mesma forma, Marshall e colaboradores, detectaram duas deleções 16p11.2 *de novo* em 427 famílias com autismo. Os autores afirmam que deleções e duplicações de 16p11.2 levam a uma susceptibilidade substancial para o autismo, e que as deleções parecem responsáveis por cerca de 1% dos casos (Marshall *et al.*, 2008).



Bjlsma et al., 2009

Kumar et al., 2008

Paciente 14

Figura 17 - Representação esquemática da região deletada no paciente 14, a sua localização no cromossoma 16 e a comparação com outras deleções encontradas noutros estudos. Os retângulos vermelhos representam os genes deletados envolvidos na deleção do paciente 14, enquanto os retângulos a verde representam os genes fora da região delectada a montante e a jusante da deleção (imagem adaptada da base de dados genómica UCSC, March 2006 <http://genome.ucsc.edu>).

No estudo reportado por Weiss e colaboradores, num total de 20 casos (incluindo gêmeos monozigóticos) reportados, 18 deleções foram *de novo* e apenas num caso foi herdada (Weiss *et al.*, 2007).

Estas microdeleções ocorrem durante o processo de recombinação na meiose por *crossing-over* desigual (figura 18).

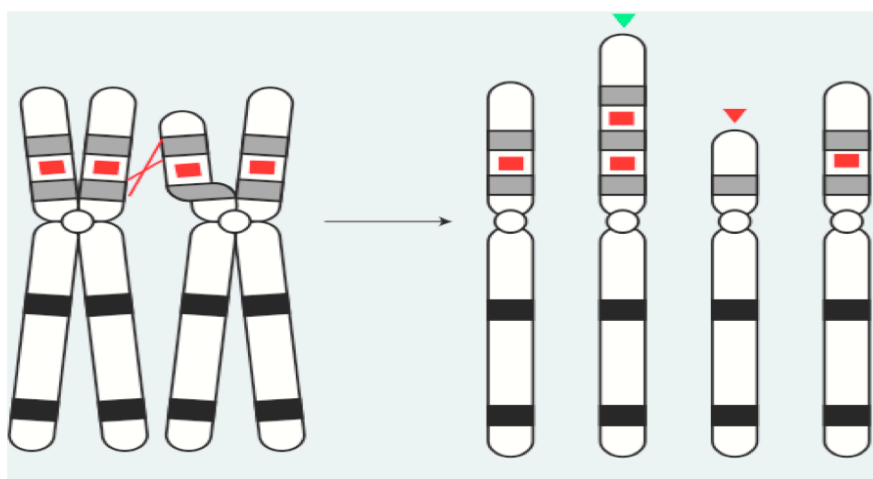


Figura 18 - Possível explicação para a formação da deleção (seta verde) e duplicação (seta vermelha) que poderá ocorrer na gametogénese. Depois do *crossing-over* desigual originam-se 4 gâmetas diferentes, duas normais, uma portadora da deleção e a outra portadora da duplicação.

3.4. Paciente 15

O paciente 15 é um adolescente de 14 anos com diagnóstico de autismo. O paciente apresentava um cariótipo normal, e pela análise dos resultados de MLPA verificou-se uma deleção na região 15q13.2-q13.3. O tamanho da deleção é de 1,17 Mb (15: 30,191,399-29,016,616). O estudo da mesma região pela técnica de MLPA em ambos os progenitores mostrou-se que a deleção era de origem paterna [mlpa 15q13(MTMR15,TRPM1,KLF13,CHRNA7)x1] (tabela 6). Embora o pai apresente a mesma alteração cromossómica tem um fenótipo normal.

Tabela 6 - Resultados obtidos através da análise do Software *Coffalyser* no paciente 15, com deleção dos loci (*MTMR15, TRPM1, KLF13, CHRNA7*) na região 15q13, utilizando o painel de sondas P343-B1.

	Mãe	Paciente 15	Pai			
Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36			
SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11.2	214	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Normal (0.92)	Normal (1.01)	Normal (1.1)
SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11.2	472	15-022.8 SNRPN-HB2-85	Normal (1.07)	Normal (1.1)	Normal (0.97)
UBE3A probe 01317-L00864	15q11.2	256	15-023.2 UBE3A Exon 13	Normal (0.99)	Normal (1)	Normal (1)
UBE3A probe 10886-L14677	15q11.2	244	15-023.2 UBE3A Exon 12	Normal (0.84)	Normal (0.97)	Normal (0.93)
UBE3A probe 10883-L11553	15q11.2	142	15-023.2 UBE3A Exon 09	Normal (0.91)	Normal (0.98)	Normal (1.03)
UBE3A probe 04620-L14668	15q11.2	161	15-023.2 UBE3A Exon 07	Normal (0.88)	Normal (0.94)	Normal (0.94)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	Normal (1)	Normal (1.03)	Normal (1.1)
ATP10A probe 11165-L12883	15q12	271	15-023.6 ATP10A Exon 06	Normal (0.93)	Normal (1.01)	Normal (0.98)
ATP10A probe 12964-L14669	15q12	137	15-023.6 ATP10A Exon 01	Normal (1.04)	Normal (0.96)	Normal (0.96)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3 Exon 1C	Normal (0.87)	Normal (0.97)	Normal (0.96)
GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	292	15-024.5 GABRB3 Exon 0E	Normal (1.12)	Normal (1.08)	Normal (1.09)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3 Exon 0E	Normal (1.05)	Normal (1.1)	Normal (1.03)
GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	148	15-024.5 GABRB3 Exon 0I	Normal (0.94)	Normal (1)	Normal (0.96)
GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	319	15-024.5 GABRB3 Exon 0E	Normal (0.89)	Normal (0.94)	Normal (0.96)
GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	184	15-024.5 GABRB3 Exon 0E	Normal (0.92)	Normal (0.95)	Normal (0.96)
GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	355	15-024.5 GABRB3 Exon 04	Normal (1.1)	Normal (1.04)	Normal (1.04)
OCA2 probe 02040-L01553	15q13.1	436	15-025.9 OCA2 Exon 22	Normal (0.94)	Normal (0.98)	Normal (0.91)
OCA2 probe 02041-L03725	15q13.1	445	15-025.9 OCA2 Exon 01	Normal (1.02)	Normal (0.92)	Normal (0.91)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	Normal (0.9)	Normal (1)	Normal (0.85)
NDNL2 probe 08377-L08231	15q13.1	178	15-027.3 NDNL2	Normal (0.96)	Normal (0.92)	Normal (0.96)
TJP1 probe 08399-L08253	15q13.1	391	15-027.8 TJP1 Exon 27	Normal (0.91)	Normal (0.92)	Normal (0.88)
TJP1 probe 08389-L14671	15q13.1	300	15-027.8 TJP1 Exon 01	Normal (0.96)	Normal (0.93)	Normal (0.92)
MTMR15 probe S0356-L13236	15q13.2	119	15-029.0 MTMR15 Exon 14	Normal (1.01)	LOH (0.51)	LOH (0.51)
MTMR15 probe S0357-L13235	15q13.2	114	15-029.0 MTMR15 Exon 1E	Normal (1.01)	LOH (0.51)	LOH (0.47)
TRPM1 probe 08397-L14672	15q13.2	374	15-029.1 TRPM1	Normal (0.93)	LOH (0.47)	LOH (0.47)
KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	166	15-029.4 KLF13	Normal (0.9)	LOH (0.51)	LOH (0.51)
CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13.3	286	15-030.2 CHRNA7	Normal (0.92)	LOH (0.47)	LOH (0.47)
SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	493	15-030.7 SCG5 Exon U3	Normal (0.92)	Normal (0.91)	Normal (0.9)
SCG5 probe 12951-L14742	15q13.3	426	15-030.7 SCG5 Exon 06	Normal (0.97)	Normal (1.13)	Normal (1.02)
LAT probe 11677-L12448	16p11.2	481	16-028.9 LAT	Normal (0.91)	Normal (0.86)	Normal (0.85)
SPN probe 11672-L12443	16p11.2	364	16-029.6 SPN	Normal (0.96)	Normal (0.91)	Normal (0.89)
MAZ probe 11669-L12440	16p11.2	238	16-029.7 MAZ	Normal (0.99)	Normal (0.86)	Normal (0.91)
MAZ probe 11673-L12444	16p11.2	418	16-029.7 MAZ	Normal (0.95)	Normal (0.85)	Normal (0.91)
MVP probe 00550-L00372	16p11.2	346	16-029.7 MVP	Normal (0.99)	Normal (0.96)	Normal (0.83)
SEZ6L2 probe 11668-L12439	16p11.2	208	16-029.8 SEZ6L2	Normal (0.95)	Normal (0.9)	Normal (0.88)
HIRIP3 probe 11674-L12445	16p11.2	454	16-029.9 HIRIP3	Normal (0.92)	Normal (0.93)	Normal (0.92)
HIRIP3 probe 11667-L14670	16p11.2	173	16-029.9 HIRIP3	Normal (0.91)	Normal (0.96)	Normal (0.92)
DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	226	16-029.9 DOC2A	Normal (0.95)	Normal (0.95)	Normal (0.9)
MAPK3 probe 11675-L12446	16p11.2	463	16-030.0 MAPK3	Normal (0.94)	Normal (0.91)	Normal (0.83)
CD2BP2 probe 11671-L12442	16p11.2	337	16-030.3 CD2BP2	Normal (0.95)	Normal (0.9)	Normal (0.83)
SHANK3 probe 06784-L06376	22q13.33	310	22-049.5 SHANK3 Exon 0E	Normal (0.95)	Normal (0.84)	Normal (0.93)
SHANK3 probe 06785-L06377	22q13.33	400	22-049.5 SHANK3 Exon 1C	Normal (1.05)	Normal (0.88)	Normal (0.95)
SHANK3 probe 06787-L07383	22q13.33	232	22-049.5 SHANK3 Exon 22	Normal (1.06)	Normal (0.88)	Normal (0.96)
Reference probe 10243-L02149	01q44	264	c	Normal (1.1)	Normal (1.05)	Normal (1.08)
Reference probe 05297-L04685	03q11	328	c	Normal (0.91)	Normal (1)	Normal (1.02)
Reference probe 07208-L06858	07p14	409	c	Normal (1.01)	Normal (0.95)	Normal (0.94)
Reference probe 10218-L14675	07q22	500	c	Normal (0.98)	Normal (1)	Normal (0.99)
Reference probe 09431-L09680	11q13	154	c	Normal (1.07)	Normal (1.02)	Normal (1.05)
Reference probe 02658-L02125	11q23	250	c	Normal (0.89)	Normal (0.95)	Normal (0.96)
Reference probe 09727-L10077	12q24	130	c	Normal (1.01)	Normal (1.02)	Normal (1)
Reference probe 09176-L09350	17q11	124	c	Normal (0.99)	Normal (0.99)	Normal (0.97)
Reference probe 09979-L10438	19p13	190	c	Normal (1)	Normal (0.98)	Normal (1.01)

A deleção no 15p13.2-q13.3 possui uma dimensão de 1,17Mb. Contudo, a deleção poderá ser maior, visto que as sondas para os genes próximos da deleção, distam 1,12 Mb (distância das sondas para MTMR15 e TJP1) a montante e 2.77 Mb (distância das sondas para CHRNA7 e SCG5) a jusante (figura 19).

Uma vez que a deleção é de origem paterna esta poderá não ser a explicação para o fenótipo autista do paciente, podendo apresentar outras alterações no genoma. Outra explicação possível poderá estar associado a penetrância incompleta no pai. A penetrância, consiste na proporção de indivíduos com uma mutação que causa uma desordem em particular e que apresentam sintomas clínicos característicos dessa desordem. A penetrância completa consiste em ter os sintomas clínicos de uma mutação característica de uma doença, e todos os indivíduos que têm essa doença apresentam fenótipo semelhante. Enquanto, na penetrância incompleta ou reduzida, os indivíduos não apresentam os sintomas clínicos ou todos os sintomas clínicos da mutação causadora de doença (Pierce, 2004).

As microdeleções em 15q13.3 também tem sido identificadas em pessoas aparentemente saudáveis, assim como em indivíduos gravemente afectados que têm características clínicas como doença cardíaca congénita, défice cognitivo, epilepsia, autismo, esquizofrenia e outros transtornos neuropsiquiátricos (Sharp *et al.*, 2008; Ben-Shachar *et al.*, 2009; Dibbens *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Dibbens e Mullen, 2009; Pagnamenta *et al.*, 2009; van Bon *et al.*, 2009).

Para compreender o fenótipo variável da região 15q13.2-q13.3 é necessário o estudo dos genes localizados nesta região. O *CHRNA7* é um gene localizado nesta região que está associado à epilepsia assim como no fenótipo de doenças neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia, transtorno bipolar e o autismo (Freedman *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2006; Flomen *et al.*, 2006; Gault *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2004).

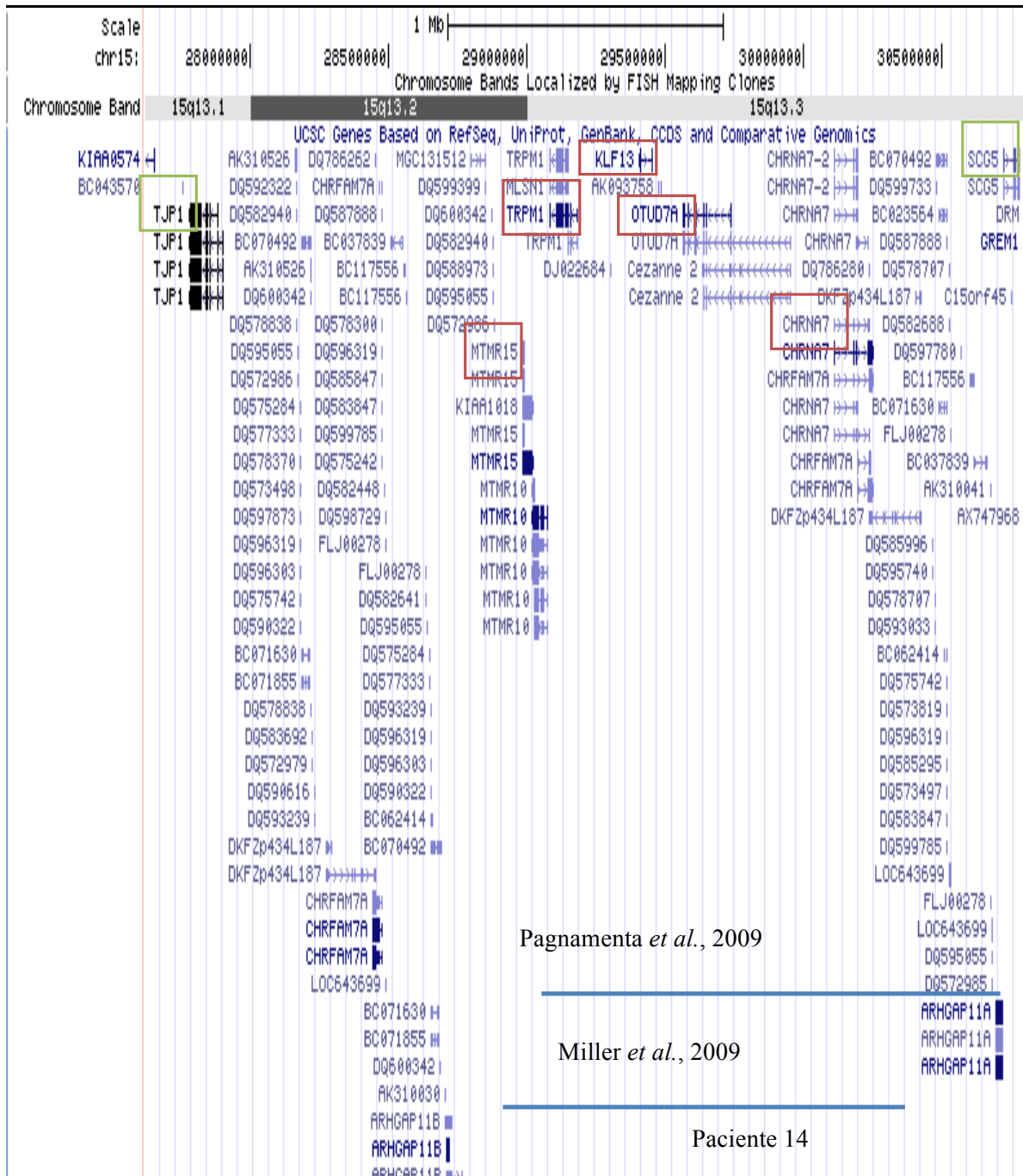
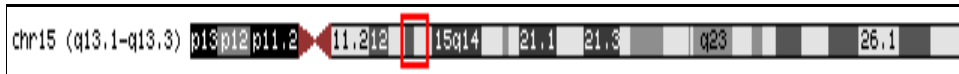


Figura 19 - Representação esquemática da região deletada no paciente 15, a sua localização no cromossoma 15 em comparação com outras deleções encontradas noutro estudo. Os retângulos vermelhos representam os genes deletados na deleção do paciente 15, os retângulos a verde representam os genes que flanqueiam a deleção e presentes no painel de sondas específico para o autismo (imagem adaptada da base de dados genómica UCSC, March 2006).

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

Conclusões

As alterações cromossômicas encontradas nos pacientes autistas estudados comprovam a sua associação ao espectro de autismo. No entanto mais estudos são necessários devido à heterogeneidade desta patologia.

Os estudos complementares para a identificação da origem parental, das alterações encontradas, são essenciais para interpretar a contribuição deste factor para o fenótipo do autismo.

Caso estas alterações encontradas não sejam por si só a causa do autismo, é muito importante procurar novas abordagens e mecanismos que possam explicar esta patologia.

O painel de sondas de MLPA usado neste trabalho, SALSA MLPA KIT P343-B1 AUTISM-1, detecta alterações em três regiões específicas, 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13. Estas regiões têm sido associadas ao autismo, sendo uma abordagem inicial favorável para o início do estudo dos pacientes autistas.

A técnica de MLPA mostra ser menos laboriosa, com capacidade de ser aplicada a um maior número de amostras comparando com outras técnicas, por exemplo a FISH. Podendo ser realizada usando o equipamento presente na maioria dos laboratórios de citogenética clínica.

Em laboratório com tecnologias de ponta uma alternativa passaria pelo cariótipo e molecular (*array*-CGH), que permite determinar o tamanho das anomalias cromossômicas, o número de genes envolvidos e diagnosticar novas regiões candidatas

A correlação do genótipo com o fenótipo foi dificultada devido à reduzida informação clínica fornecida ao laboratório com o pedido de estudo. É importante após um resultado de patologia uma interação sistemática com as equipas clínicas de modo a permitir a co-relação genótipo-fenótipo.

A identificação de anomalias cromossômicas num indivíduo com autismo permite identificar famílias em risco de serem portadoras de alterações cromossômicas e consequentemente de serem orientadas para estudos laboratoriais.

Portadores de alterações cromossômicas equilibradas tem um risco de terem descendentes com desequilíbrios, consequentemente são alertadas para a possibilidade de diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

Referências Bibliográficas

- Abrahams, B. S., Geschwind D. H. (2008). Advances in autism genetics: On the threshold of a new neurobiology (vol 9, pg 341, 2008). *Nature Reviews Genetics*, 9(6).
- Ancans J., Tobin D.J., Hoogduijn M.J., Smit N.P., *et al.*, (1998) Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res* 2001, 268(1):26-35. A full genome screen for autism with evidence for *linkage* to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Human Molecular Genetics*.7(3):571-578.
- Anderson G.M., Freedman D.X., Cohen D.J., *et al.*, (1987). Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *Journal Child Psychol Psychiatry*, 28(6):885-900.
- Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, *et al.*, Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics* 1999, 61(3):227-236.
- Asperger H. (1994). Die autistischen psychopathen im kindesalter. *Archiv fur Psychiatric und Nervenkrankheiten*.17: 76-36.
- Bailey, A., Lecouteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., *et al.*, (1995). Autism as a strongly genetic disorder - evidence from a british twin study. *Psychological Medicine*, 25(1), 63-77.
- Beglinger L.J., Smith T.H. (2001). A review of subtyping in autism and proposed dimensional classification model. *Journal of Autism and Developmental Disorder*. 31(4): 411-422.
- Ben-Shachar, S., Lanpher, B., German, J. R., *et al.*, (2009). Microdeletion 15q13.3: A locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, 46(6), 382-388
- Bettelheim B. The empty fortress; Infantile autism and the birth of the self. 1967. Free Pass Nova Yorque.
- Beyer K. S., Blasi F., Bacchelli, *et al.*, (2002). Mutation analysis of the coding sequence of the mecp2 gene in infantile autism. *Human Genetics*, 111(4-5), 305-309.
- Bijlsma, E. K., Gijsbers, A. C. J., Schuurs-Hoeijmakers, *et al.*, (2009). Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: Deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *European Journal of Medical Genetics*, 52(2-3), 77-87.
- Bird A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 (6067): 209-213.
- Bittel, D. C., Kibiryeva, N., Butler, M. G. (2007). Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genetic Testing*, 11(4), 467-475.
- Bolton, P. F., Dennis, N. R., Browne, C. E., *et al.*, (2001). The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics*, 105(8), 675-685.
- Bonati, M. T., Russo, S., Finelli, P., *et al.*, (2007). Evaluation of autism traits in angelman syndrome: A resource to unfold autism genes. *Neurogenetics*, 8(3), 169-178.
- Bonora, E., Bacchelli, E., Levy, E. R., *et al.*, Int Mol Genetic Study Autism, C. (2002). Mutation screening and imprinting analysis of four candidate genes for autism in the 7q32 region. *Molecular Psychiatry*, 7(3), 289-301.
- Bottini, N., De Luca, D., Saccucci, P., *et al.*, (2001). Autism: Evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics*, 3(2), 111-113.
- Boyar, F. Z., Whitney, M. M., Lossie, A. C., *et al.*, (2001). A family with a grand-maternally derived interstitial duplication of proximal 15q. *Clinical Genetics*, 60(6), 421-430.
- Carney, R. M., Wolpert, C. M., Ravan, S. A., *et al.*, (2003). Identification of mecp2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatric Neurology*, 28(3), 205-211.

- Castermans, D., Wilquet, V., Steyaert, J., *et al.*, (2004). Chromosomal anomalies in individuals with autism - a strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism*, 8(2), 141-161.
- Cai, G., Edelmann, L., Goldsmith, J. E., *et al.*, (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in asmt. *Bmc Medical Genomics*, 1.
- Chakrabarti, S., & Fombonne, E. (2005). Pervasive developmental disorders in preschool children: Confirmation of high prevalence. *American Journal of Psychiatry*, 162(6), 1133-1141.
- Conciatori, M., Stodgell, C. J., Hyman, *et al.*, (2004). Association between the *hoxa1* a218g polymorphism and increased head circumference in patients with autism. *Biological Psychiatry*, 55(4), 413-419.
- Cook, E. H., Courchesne, R., Lord, C., *et al.*, (1997). Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Molecular Psychiatry*, 2(3), 247-250.
- D'Alton M., Malone F., Chelmow D., *et al.*, (1997). Defining the role of fluorescent in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidias. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 176: 769-774.
- De Luca, V., Likhodi, O., Van Tol, H. H. M., *et al.*, (2006). Regulation of alpha 7-nicotinic receptor subunit and alpha 7-like gene expression in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 114(3), 211-215.
- Depienne, C., Moreno-De-Luca, D., Heron, D., *et al.*, (2009). Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry*, 66(4), 349-359.
- Dibbens, L. M., Mullen, S., Helbig, I., *et al.*, Consortium, E. (2009). Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: Precedent for disorders with complex inheritance. *Human Molecular Genetics*, 18(19), 3626-3631.
- Dittrich, B., Buiting, K., Korn, B., *et al.*, (1996). Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the *SNRPN* gene. *Nature Genetics*, 14(2), 163-170.
- Dykens, E. M., Sutcliffe, J. S., & Levitt, P. (2004). Autism and 15q11-q13 disorders: Behavioral, genetic, and pathophysiological issues. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 10(4), 284-291.
- Dudarewicz L., Hozgreve W., Jeziorowska A., *et al.*, (2005). Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* 46: 207-215.
- Eisenberg L. The fathers of autistic children. *American Journal Orthopsychiatry* 1957; 127:715-724. Fan Y. (2002) *Molecular cytogenetics. Protocols and applications*. New Jersey: Human Press.
- Fan Y. (2002) *Molecular cytogenetics. Protocols and applications*. New Jersey: *Human Press*.
- Fan, J. B., Ma, J., Li, X. W., *et al.*, (2006). Population-based and family-based association studies of an (ac)n dinucleotide repeat in alpha-7 nicotinic receptor subunit gene and schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 84(2-3), 222-227.
- Fatemi, S. H., Stary, J. M., Halt, A. R., & Realmuto, G. R. (2001). Dysregulation of reelin and bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 31(6), 529-535.
- Feldman, B., Ebrahim, S. A. D., Hazan, S. L., *et al.*, (2000). Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by fish studies in high-risk pregnancies. *American Journal of Medical Genetics*, 90(3), 233-238.
- Fine, S. E., Weissman, A., Gerdes, M., Pinto-Martin, J., Zackai, E. H., McDonald-McGinn, D. M., & Emanuel, B. S. (2005). Autism spectrum disorders and symptoms in children with molecularly confirmed 22q11.2 deletion syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(4), 461-470.
- Flint, J., & Knight, S. (2003). The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(3), 310-316.
- Flomen, R. H., Collier, D. A., Osborne, S., *et al.*, (2006). Association study of *chr7a* copy number and 2bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 141B(6), 571-575

- Folstein SE, Rosen-Sheidley B (2001). Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Genetics Review*; 2:943-955.
- Freedman, R., Leonard, S., Gault, J. M., *et al.*, (2001). Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (chrna7). *American Journal of Medical Genetics*, 105(1), 20-22.
- Freitag C.M. (2007). The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Molecular Psychiatry*, 12(1):2-22.
- Freitag, C. M., Staal, W., Klauck, S. M., *et al.*, (2010). Genetics of autistic disorders: Review and clinical implications. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 19(3), 169-178.
- Gardner R., Sutherland G. (2004). Chromosome abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press, 3a edição.
- Gault, J., Hopkins, J., Berger, R., *et al.*, (2003). Comparison of polymorphisms in the alpha 7 nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 123B(1), 39-49.
- Gharani, N., Benayed, R., Mancuso, V., *et al.*, (2004). Association of the homeobox transcription factor, engrailed 2, 3, with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 9(5), 474-484.
- Ghaziuddin, M., & Burmeister, M. (1999). Deletion of chromosome 2 q37 and autism: A distinct subtype? *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 29(3), 259-263.
- Gilberg C (1998) Chromosomal disorders and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5):415-425.
- Glessner J.T., Wang K., Cai G. (2009) Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*.459(7246): 569-573.
- Goossens E, Decock P, Potgieter S, Fryns JP. Mosaic normal/15q11-q13 duplication associated with developmental delay but normal phenotype. *Genetic Couns* 1999;10:133-136.
- Heilstedt, H. A., Ballif, B. C., Howard, L. A., *et al.*, (2003). Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clinical Genetics*, 64(4), 310-316.
- Herzing, L. B. K., Cook, E. H., & Ledbetter, D. H. (2002). Allele-specific expression analysis by rna-fish demonstrates preferential maternal expression of ube3a and imprint maintenance within 15q11-q13 duplications. *Human Molecular Genetics*, 11(15), 1707-1718.
- Hettinger, J. A., Liu, X., & Holden, J. J. A. (2008). The g22a polymorphism of the ada gene and susceptibility to autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(1), 14-19.
- Hochstenbach R., Meijer J., van de Burg J., *et al.*, (2005). Rapid detection of chromosomal aneuploidias in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenatal Diagnosis* 25: 1032-1039.
- Hong, C. J., Lai, I. C., Liou, L. L., & Tsai, S. J. (2004). Association study of the human partially duplicated alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor genetic variant with bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, 355(1-2), 69-72.
- Hogart A., Leung K., Wang N., *et al.*, (2008). Chromosome 15q11-13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J Med Genet* 46 (2): 86-93.
- Hultén M., Dhanjal S., Pertl B. (2003). Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 126: 279-297.
- Kato C., Tochigi M., Ohashi J., *et al.*, (2008). Association Study of the 15q11-q13 Maternal domain Expression in Japanese Autistic Patients. *American Journal of Medical Genetics: Neuropsychiatric Genetics* 147B: 1008-1012.
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., & Sudhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2676-2682.

- Insel, T. R., O'Brien, D. J., & Leckman, J. F. (1999). Oxytocin, vasopressin, and autism: Is there a connection? *Biological Psychiatry*, 45(2), 145-157.
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, *et al.*, (2006) Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *Journal Medical Genetics*. 43(11):843-849.
- Jalali, G.R. (2008). Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human Mutation*, 29, 433-440.
- Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., *et al.*, Paris Autism Res Int Sibpair, P. (2002). Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Molecular Psychiatry*, 7(3), 302-310.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., *et al.*, Paris Autism Res Int Sibpair, S. (2003). Mutations of the x-linked genes encoding neuroligins nlg3 and nlg4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34(1), 27-29.
- Kanner L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 2: 217-250.
- Kim, S. J., Herzing, L. B. K., Veenstra-VanderWeele, J., *et al.*, (2002). Mutation screening and transmission disequilibrium study of atp10c in autism. *American Journal of Medical Genetics*, 114(2), 137-143.
- Klauck, S. M., Poustka, F., Benner, A., *et al.*, (1997). Serotonin transporter (5-htt) gene variants associated with autism? *Human Molecular Genetics*, 6(13), 2233-2238.
- Kumar, R. A., KaraMohamed, S., Sudi, J., *et al.*, (2008). Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*, 17(4), 628-638.
- Lauritsen M, Mors O, Mortensen PB, Ewald H. (1999). Infantile autism and associated autosomal chromosome abnormalities: a register-based study and a literature survey. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 40(3):335-345.
- Levitt P., Campbell D.B. (2009). The genetic and neurobiologic compass points toward common signalling dysfunctions in ASD. *Journal of Clinical Investigation*. 119(4): 747-754.
- Li, H., Yamagata, T., Mori, M., & Momoi, M. Y. (2005). Absence of causative mutations and presence of autism-related allele in foxp2 in Japanese autistic patients. *Brain & Development*, 27(3), 207-210.
- Lord, C., Cook, E. H., Leventhal, B. L., & Amaral, D. G. (2000). Autism spectrum disorders. *Neuron*, 28(2), 355-363.
- Lukusa, T., Vermeesch, J. R., Holvoet, M., *et al.*, (2004). Deletion 2q37.3 and autism: Molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. *Genetic Counseling*, 15(3), 293-301.
- Ma, D. Q., Whitehead, P. L., Menold, M. M., *et al.*, (2005). Identification of significant association and gene-gene interaction of gaba receptor subunit genes in autism. *American Journal of Human Genetics*, 77(3), 377-388.
- Maestrini E., Lai C., Marlow A., *et al.*, (1999) Serotonin transporter (5-HTT) and gamma aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *American Journal of Medical Genetics*. 88(5):492-496.
- Mann K., Donaghue C., Fox S., *et al.*, (2004). Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European Journal of Human Genetics* 12: 907-915.
- Manning, M. A., Cassidy, S. B., Clericuzio, C., *et al.*, (2004). Terminal 22q deletion syndrome: A newly recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum. *Pediatrics*, 114(2), 451-457.
- Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., *et al.*, (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 477-488.
- Menold, M. M., Shao, Y. J., Wolpert, C. M., *et al.*, (2001). Association analysis of chromosome 15 gaba(a) receptor subunit genes in autistic disorder. *Journal of Neurogenetics*, 15(3-4), 245-259.
- Modahl, C., Green, L., Fein, D., *et al.*, (1998). Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biological Psychiatry*, 43(4), 270-277.

- Miller, D. T., Shen, Y., Weiss, L. A., *et al.*, (2009). Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *Journal of Medical Genetics*, 46(4), 242-248.
- Mohandas, T. K., Park, J. P., Spellman, R. A., *et al.*, (1999). Paternally derived *de novo* interstitial duplication of proximal 15q in a patient with developmental delay. *American Journal of Medical Genetics*, 82(4), 294-300.
- Muhle R., Trentacoste S.V., Rapin I. (2004) .The genetics of autism. *Pediatrics*. 113 (5):472-486.
- Mundle, S. D., & Sokolova, I. (2004). Clinical implications of advanced molecular cytogenetics in cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(1), 71-81.
- Murthy, S. K., & Demetrick, D. J. (2006). New approaches to fluorescence in situ hybridization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 319, 237-259.
- Neumann, B. Barlow, D.P. (1996). Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Current Opinion in Genetics & Development*.6:159-163.
- Nicolini, U., Lalatta, F., Natacci, F., *et al.*, (2004). The introduction of qf-pcr in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: Time for reconsideration. *Human Reproduction Update*, 10(6), 541-548.
- Nurmi, E. L., Amin, T., Olson, L. M., *et al.*, (2003). Dense linkage disequilibrium mapping in the 15q11-q13 maternal expression domain yields evidence for association in autism. *Molecular Psychiatry*, 8(6), 624-634.
- Nurmi, E. L., Bradford, Y., Chen, Y. H., *et al.*, (2001). Linkage disequilibrium at the angelman syndrome gene ube3a in autism families. *Genomics*, 77(1-2), 105-113.
- Nurmi, E. L., Dowd, M., Tadevosyan-Leyfer, O., *et al.*, (2003). Exploratory subsetting of autism families based on savant skills improves evidence of genetic linkage to 15q11-q13. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 42(7), 856-863.
- Oliveira, G., Ataide, A., Marques, C., *et al.*, (2007). Epidemiology of autism spectrum disorder in portugal: Prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 49(10), 726-733.
- Ott J. Analysis of Human Genetics *Linkage*. 3rd Edition (1999). John Hopkins University Press. Baltimore, London.
- Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to gaba than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 715-727.
- Pagnamenta, A. T., Wing, K., Akha, E. S., *et al.*, (2009). A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *European Journal of Human Genetics*, 17(5), 687-692.
- Persico, A. M., Militerni, R., Bravaccio, C., *et al.*, (2000). Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples. *American Journal of Medical Genetics*, 96(1), 123-127.
- Petit, E., Heralut, J., Martineau, J., *et al.*, . Muh, J. P. (1995). Association study with 2 markeres of a human homegene in infantile-autism. *Journal of Medical Genetics*, 32(4), 269-274.
- Pikaard, C.S., (2000). The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends In Genetics* 16: 495-500
- Pierce, B. (2004). *Genetics*. New Yorq and Basingstoke: W.H. Freeman and co.
- Razin, A. e H. Cedar. (1994). DNA methylation and genomic imprinting. *Cell*, 77: 473-476.
- Reik W., Walter J. (2001). Genomic Imprinting: Parental Influence on the Genome. *Nature Reviews Genetics* 2:21-32.
- Reppeto G. (2001). Genomic *imprinting* and human chromosome 15. *Biological Research* V 34 n.2.
- Riggs, A.D., e Pfeifer GP (1992). X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genetics*, 8: 169-174.

- Robertson, K.D., (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6: 597- 610
- Rosenfeld, J. A., Coppinger, J., Bejjani, B. A., *et al.*, (2010). Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2(1), 26-38.
- Klauck, S. M. (2006). Genetics of autism spectrum disorder. *European Journal of Human Genetics*, 14(6), 714-720.
- Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., *et al.*, (2007). Impaired cerebellar development and function in mice lacking caps2, a protein involved in neurotrophin release. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2472-2482
- Schanen, N. C. (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*, 15, R138-R150.
- Scheiffele, P., Fan, J. H., Choih, J., *et al.*, (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6), 657-669.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. [Article]. *Nucleic Acids Research*, 30(12).
- Schroer, R. J., Phelan, M. C., Michaelis, R. C., *et al.*, (1998). Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *American Journal of Medical Genetics*, 76(4), 327-336.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., *et al.*, (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316(5823), 445-449.
- Sellner, L. N., & Taylor, G. R. (2004). Mlpa and maph: New techniques for detection of gene deletions. [Review]. *Human Mutation*, 23(5), 413-419.
- Serajee, F. J., Zhong, H., Nabi, R., & Huq, A. (2003). The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: Partial duplication and possible association with autism. *Journal of Medical Genetics*, 40(4).
- Shaffer, L. G., & Bejjani, B. A. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Human Reproduction Update*, 10(3), 221-226.
- Sharkey, F. H., Maher, E., & FitzPatrick, D. R. (2005). Chromosome analysis: What and when to request. *Archives of Disease in Childhood*, 90(12), 1264-1269.
- Sharp, A. J., Mefford, H. C., Li, K., Baker, C., *et al.*, (2008). A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nature Genetics*, 40(3), 322-328.
- Shibayama, A., Cook, E. H., Feng, J. N., *et al.*, (2004). Mecp2 structural and 3'-utr variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: A possible association with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 128B(1), 50-53.
- Skaar, D. A., Shao, Y., Haines, J. L., *et al.*, (2005). Analysis of the reln gene as a genetic risk factor for autism. *Molecular Psychiatry*, 10(6), 563-571.
- Slater, H. R., Bruno, D. L., Ren, H., *et al.*, (2003). Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (mlpa). *Journal of Medical Genetics*, 40(12), 907-912.
- Steyaert, J. G., & De la Marche, W. (2008). What's new in autism? *European Journal of Pediatrics*, 167(10), 1091-1101.
- Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., *et al.*, (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, 39(3), 319-328.
- Talebizadeh, Z., Lam, D. Y., Theodoro, M. F., *et al.*, (2006). Novel splice isoforms for nlgn3 and nlgn4 with possible implications in autism. *Journal of Medical Genetics*, 43(5). doi: e21
- Tepperberg, J., Pettenati, M. J., Rao, P. N., *et al.*, (2001). Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (fish): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 21(4), 293-301.
- Theisen, A. (2008). Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education*.1.

- van Bon, B. W. M., Mefford, H. C., Menten, B., *et al.*, (2009). Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: A clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *Journal of Medical Genetics*, 46(8), 511-523.
- Veenstra-VanderWeele, J., Christian, S. L., & Cook, E. H. (2004). Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 379-405.
- Verma R., Babu A. (1995). Human chromosomes. Principles and techniques. New York: McGraw-Hill, Inc 2a edição, ISBN 0-07-113773-113774.
- Vervoort, V. S., Beachem, M. A., Edwards, P. S., *et al.*, (2002). Agr2 mutations in x-linked mental retardation. *Science*, 296(5577), 2401-2403.
- Vincent, J. B., Herbrick, J. A., Gurling, H. M. D., *et al.*, (2000). Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual. *American Journal of Human Genetics*, 67(2), 510-514.
- Volkmar F.R., Pauls D. Autism. *Lancet*. (2003).362(9390):1133-1141. Review.
- Volkmar, F. R., Szatmari, P., & Sparrow, S. S. (1993). Sex-differences in pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 23(4), 579-591.
- Vorstman, J. A. S., Staal, W. G., van Daalen, E., *et al.*, (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 18-28.
- Wassink, T. H., Piven, J., Vieland, V. J., *et al.*, (2001). Evidence supporting wnt2 as an autism susceptibility gene. *American Journal of Medical Genetics*, 105(5), 406-413.
- Weiss L.A., Yiping Shen D., Korn J.M., *et al.*, (2007) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism, *N. Engl. J. Med.* 358 1–9.
- Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., *et al.*, (2008). Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *New England Journal of Medicine*, 358(7), 667-675.
- Wigler M., Levy D., Perucho M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell* 24(1): 33-40.
- Wing L. (1997). The autistic spectrum. *Lancet*; 350: 1761-1766.
- Winslow, J. T., & Insel, T. R. (2002). The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*, 36(2-3), 221-229.
- Wolffe, A., Matzke M. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286: 481- 486.
- Xu, J. Z., Pato, M. T., Dalla Torre, C., *et al.*, (2001). Evidence for linkage disequilibrium between the alpha 7-nicotinic receptor gene (chrna7) locus and schizophrenia in azorean families. *American Journal of Medical Genetics*, 105(8), 669-674.
- Yoon, H. R., Park, Y. S., & Kim, Y. K. (2002). Rapid prenatal detection of down and edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat markers. *Yonsei Medical Journal*, 43(5), 557-566.
- Zhang, H., Liu, X., Zhang, C., *et al.*, (2002). Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry*, 7(9), 1012-1017.
- Zhao, X., Pak, C., Smrt, R. D., & Jin, P. (2007). Epigenetics and neural developmental disorders - washington dc, september 18 and 19, 2006. *Epigenetics*, 2(2), 126-134.
- Zhong N., Ye L., Ju W., *et al.*, (1999). 5-HTTLPR variants not associated with autistic spectrum disorders. *Neurogenetics*.2(2):129-131.

www.ensembl.org

www.genome.gov

www.mlpa.com

