



2008



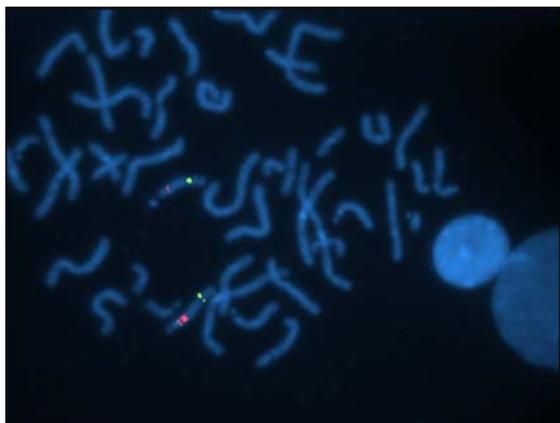
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da etiologia do Autismo utilizando as técnicas de FISH e MLPA

Sónia M. T. M. Almeida

Estudo da etiologia do Autismo utilizando as técnicas de FISH e MLPA



Sónia Margarida Tavares Matos Almeida

2008



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da etiologia do Autismo utilizando as técnicas de FISH e MLPA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Marques Carreira (Laboratório de Citogenética do Instituto de Biologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e supervisão da Professora Doutora Emília Duarte (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Sónia Margarida Tavares Matos Almeida

2009

Agradecimentos

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 Emília Pedrosa Duarte, coordenadora do Mestrado em Biologia Celular e Molecular, por todo o seu apoio e disponibilidade constantes durante a elaboração desta tese.

A toda a equipa do Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde desenvolvi o meu trabalho, agradeço todo o apoio, colaboração, disponibilidade e amizade demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos colegas José Ferrão e Catarina Mendes gostaria de agradecer a orientação científica, apoio, compreensão, disponibilidade e amizade demonstrados.

À Doutora Guiomar Oliveira desejo expressar o meu muito obrigado pelo levantamento dos processos clínicos dos pacientes.

A todos os pacientes, cujas amostras foram estudadas neste trabalho, desejo agradecer.

Às amigas e colegas Rute e Andreia, pela amizade, confiança e apoio durante a realização deste trabalho

Aos meus tios/padrinhos João, Deolinda e Isabel, pela amizade, incentivo, carinho e confiança que sempre depositaram em mim.

À minha grande amiga Ana pela presença constante, amizade, apoio e incentivo para prosseguir com este trabalho sem desanimar.

Ao querido amigo Zé Carlos pela amizade, compreensão, incentivo e apoio sempre demonstrados em todos os momentos.

Ao Pedro, por todo o carinho, força, coragem, apoio, e por estar sempre presente, mesmo estando distante.

Aos meus pais, desejo expressar o meu profundo reconhecimento pelo seu amor, apoio e encorajamento ao longo de toda a vida.

Lista de Abreviaturas

aCGH- *array Comparative Genomic Hybridization*

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

AS – *Angelman Syndrome*

ASD – *Autism Spectrum Disorders*

ATP10A- *ATPase, Class V, type 10A*

ATP10C- *ATPase, Class V, type 10C*

BP1- *Breakpoint 1*

BP2- *Breakpoint 2*

BP3- *Breakpoint 3*

BP4- *Breakpoint 4*

BP5- *Breakpoint 5*

CSMD3- *CUB and Sushi multiple domains 3*

CYFIP1- *Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1*

DLX1- *gene distal-less homeobox 1*

DLX2- *gene distal-less homeobox 2*

DLX5- *gene distal-less homeobox 5*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA- *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

FISH – *Fluorescent in situ Hybridization*

FMR1- *fragile X mental retardation 1*

FMRP1- *cytoplasmic FMR interacting protein 1*

FOXP2 - *forkhead box P2*

GABA- *Gamma-aminobutyric acid*

GABA_A- *Gamma-aminobutyric acid type A*

GABRA5- *Gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 5*

GABRB3- *Gamma-aminobutyric acid A receptor, beta 3*

GABRG3- *Gamma-aminobutyric acid A receptor, gamma 3*

GRIK2/GLUR6- *glutamate receptor, ionotropic kainate 2*

HOXA1- *gene Homeobox A1*

HOXB1- *gene Homeobox B1*

IC- *Imprinting Center*

Idic(15)- *cromossoma 15 isodicêntrico*

IMMPL2 - *Mitochondrial inner membrane protease subunit 2*

inv dup(15) – inversão e duplicação do cromossoma 15

Kb– kilo base

LCRs- *Low copy repeats*

MAGEL2- *MAGE-like protein 2*

Mat- materna

Mb – Mega bases

MED- *Maternal Expression Domain*

MECP2- *Methyl-CpG-binding protein 2*

MEST- *Mesoderm-specific transcript homolog protein*

MKRN3- *Makorin ring finger protein 3*

ml- mililitros

µl- microlitros

MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MS-MLPA- *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

mRNA - *Messenger Ribonucleic Acid*

NDN- gene *necdin homolog (mouse)*

NF1- *Neurofibromin 1*

ng – nanograma

NIPA1 – *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1*

NIPA2 – *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2*

NLGN4- *Neuroigin 4, X-linked precursor*

NMDAR- *N-methyl D-aspartate Receptor*

NPTX2- *Neuronal pentraxin II*

OCA2- *Oculocutaneous albinism II*

OT Receptor- *Oxytocin Receptor*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PTEN- *phosphatase and tensin homolog*

PWS – *Prader-Willi Syndrome*

PW/ASCR- Região crítica para as síndromes de *Prader-Willi e Angelman*

QF-PCR – *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*

RELN- *Reelin*

RNA - *Ribonucleic Acid*

rpm- rotações por minuto

SCRT- *Secretin Receptor*

SHANK2- *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*

SLC6A4 - *Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4*

SMC- *Supernumerary marker chromosomes*

SmN- *small nucleoprotein N*

SNRPN- *Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*

SNURF- *SNRPN upstream reading frame*

SPG6- gene para paraplegia espástica 6

SSC- *Saline Sodium Citrate*

ST7/RAY1 - *Suppressor of tumorigenicity protein 7*

TSC2- *Tuberous sclerosis 2 complex*

TUBGCP5- *Tubulin, gamma complex associated protein 5*

UBE3A- *Ubiquitin protein ligase E3A*

UPD- *Uniparental Disomy*

WNT2 - *Wingless-type MMTV integration site family member 2*

Índice Geral

Resumo	14
Abstract.....	16
1-Introdução	18
1.1 – Definição da desordem autista	19
1.2 – Epidemiologia.....	19
1.3 – Genética do autismo.....	20
1.3.1-Endofenótipos	21
1.4- Epigenética do autismo.....	21
1.5- A procura de genes candidatos	22
1.6- Os <i>loci</i> candidatos.....	23
1.6.1- Região cromossómica 15q11-q13.....	25
1.6.2 – Genes com expressão alterada nas deleções e duplicações da região 15q11-q13.....	32
1.7- Tecnologias para o estudo da etiologia do autismo	37
1.7.1 – Citogenética convencional	37
1.7.2- Novas tecnologias complementares de biologia molecular.....	39
1.7.2.1- <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>	40
1.7.2.2- <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	42
1.7.2.3 – <i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	46
2 - Objectivos	48
3 - Materiais e Métodos	50
3.1- Amostra	51
3.2- Citogenética Convencional.....	51
3.3- <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>	52
3.3.1- Análise microscópica	54
3.4- <i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	54
3.4.1- Extracção de DNA pelo Kit JETQUICK Blood Midi/Maxi Spin	54
3.4.2- Reacção de MS-MLPA.....	54
4- Resultados	58
5- Discussão.....	85
6- Conclusão	96

7- Referências Bibliográficas	99
8- Anexos.....	112
8.1- Anexo A.....	113
8.2- Anexo B.....	114

Índice de Figuras

- Figura 1:** Técnicas utilizadas na pesquisa de genes candidatos ao autismo. Os investigadores usam diversas técnicas experimentais e modelos patofisiológicos do autismo para identificar os genes candidatos. 23
- Figura 2:** a) Representação esquemática da região 15q11-q13, associada ao autismo, localizada no braço longo do cromossoma 15. b) Mapa do cromossoma 15, indicando a região crítica para as síndromes de PWS e AS, localizada entre os pontos de quebra BP2 e BP3. Os genes presentes nesta região estão representados no mapa. Os genes de expressão paterna estão indicados a amarelo e os de expressão materna a rosa. Os pontos de quebra estão indicados nas caixas roxas. Os traços vermelhos indicam as regiões delectadas nas síndromes de PWS/AS. Os traços verdes indicam as regiões envolvidas nas duplicações intersticiais e nos cromossomas isodicêntricos supranumerários, associadas ao autismo. 26
- Figura 3:** Representação esquemática da região 15q11-q13 e do domínio de expressão materna (MED). As regiões delimitadas pelas setas indicam os genes de expressão paterna, os genes de expressão materna e a região associada ao autismo. O esquema mostra a localização dos genes e do centro de *imprinting*. 27
- Figura 4:** a) Representação esquemática que mostra o mapa do ponto de quebra BP3A/BP3B. b) Parte do ponto de quebra BP3, que mostra a extensão distal das duplicações maternas entre S12 e S24. 29
- Figura 5:** Representação esquemática da região 15q11-q13, associada ao autismo com os *hotspots* para as delecções (BP1, BP2 e BP3), e os quatro pontos de quebra diferentes: um associado ao ponto de quebra da região delectada em PWS/AS (BP3), um localizado entre GABRB3 e D15S12, e outros dois distais a D15S1043. 31
- Figura 6:** Representação esquemática dos genes com expressão alterada nas delecções e duplicações da região 15q11-q13. 32
- Figura 7:** Cariograma humano (46,XY), com bandagem GTG. 38
- Figura 8:** Diagrama das principais etapas da técnica de FISH. Ocorre ligação da sonda de DNA à molécula fluorescente, de modo a que se possa observar ao microscópio. A palavra *in situ* significa que a hibridização ocorre no local, neste caso, no interior do núcleo das células que foram previamente fixadas em lâminas. 40
- Figura 9:** Descrição dos passos envolvidos na técnica de MLPA. Esta tecnologia é baseada na identificação das sequências alvo pela hibridização das sondas de MLPA,

que se ligam às sequências adjacentes, unindo-se através de uma reacção de ligação. As sequências são amplificadas por uma reacção de PCR, usando um único par de *primers*.

.....	43
Figura 10: Exemplo dos resultados obtidos pela técnica de MLPA.	44
Figura 11: Descrição dos passos envolvidos na técnica de MS-MLPA. Protocolo semelhante à reacção <i>standart</i> de MLPA, em que a principal diferença é o uso de uma enzima de restrição sensível à metilação. Depois da digestão com esta enzima, apenas as amostras não digeridas, ou seja, metiladas são amplificadas por PCR, detectando-se um sinal por electroforese capilar que se traduz num pico de tamanho variável.	47
Figura 12: Representação esquemática da localização das sondas utilizadas para o estudo por FISH, da região 15q11.2, associada ao autismo.	52
Figura 13: Representação esquemática da região 15q11-q13, com a localização das sondas usadas na FISH e das sondas usadas na MS-MLPA. Os genes MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e o GABRB3 estão localizados na região crítica para as síndromes de PWS e AS. Os genes TUBGCP5 e NIPA1 estão localizados entre os pontos de quebra BP1 e BP2. E o gene APBA2 que está localizado fora da região crítica para as síndromes de PWS e AS.	60
Figura 14: Distribuição das anomalias cromossómicas encontradas em 1,6% (7/429) dos pacientes.	61
Figura 15: Cariótipo, com bandas GTG do caso 1, mostrando um cromossoma supranumerário (marcador) de origem desconhecida.	63
Figura 16: Caso 1: FISH em metafase, em que o cromossoma marcador mostrou ter origem no cromossoma 15, uma vez que apresentou sinais de hibridização com 3 sondas específicas. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma derivativo. Hibridização com a) sonda centromérica D15Z4 (vermelho) b) sonda de sequência única UBE3A (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde) e c) sonda de sequência única SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde), para a região 15q11.2, do paciente 1.	64
Figura 17: Cariótipo, com bandas GTG da mãe do paciente 1, mostrando um cromossoma supranumerário semelhante ao observado na filha (Figura 15).	64
Figura 18: FISH em metafase da mãe do paciente 1 com as sondas a) UBE3A (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde) e b) SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde), para a região 15q11.2, mostrando a	

tetrasomia 15q11.2. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma derivativo	65
Figura 19: Caso 2: a) Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. b) Par de cromossomas 15 com a duplicação da região proximal no homólogo da direita.	66
Figura 20: Caso 2: FISH em metafase com as sondas a) D15S10 (região crítica e região controlo a vermelho; centrómero a verde) e b) SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho; centrómero a verde), para a região 15q11.2, do paciente 2, mostrando uma duplicação da região 15q11.2. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma duplicado.	66
Figura 21: Caso 2: Re-hibridização pela FISH da região 15q11.2, com duas sondas, tanto em metafase (a-b), como em interfase (c-d), mostrando uma triplicação com a) sonda UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde), b) sonda SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde), c) sonda UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e d) sonda SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde). A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma com a triplicação.	67
Figura 22: Caso 3: Cariótipo, com bandas GTG, do paciente 3, mostrando a) uma linha celular normal 46,XY, b) uma linha celular com um anel supranumerário, c) uma linha celular com anel duplicado supranumerário.	70
Figura 23: Caso 3: FISH em metafase com a sonda D15Z4, em que se observa um anel supranumerário (a) e um anel duplicado supranumerário (b). Hibridização com as sondas c) UBE3A (região crítica a vermelho; centrómero a verde) e d) SNRPN (região crítica a vermelho; centrómero a verde). O anel derivado do cromossoma 15 não abrange a região crítica 15q11.2 (SNRPN-, UBE3A-). A seta indica a hibridização da sonda D15Z4 no cromossoma marcador.	71
Figura 24: Caso 3: Cariótipo mos 47,XX+r(15), por bandas GTG, da mãe do paciente 3, mostrando um cromossoma extra marcador, semelhante ao observado na linha predominante do filho (Figura 22).	73
Figura 25: Caso 4: a) Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. b) Par de cromossomas 15 com a duplicação da região proximal no homólogo da direita.	74
Figura 26: Caso 4: FISH em metafase com as sondas a) UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e b) SNRPN (região crítica a vermelho; região	

controle a verde), para a região 15q11.2, do paciente 4, mostrando uma duplicação desta região. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma com a duplicação.	74
Figura 27: Caso 5: a) Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. b) Par de cromossomas 15 com a triplicação da região proximal no homólogo da direita.....	76
Figura 28: Caso 5: FISH em metafase com as sondas a) UBE3A (região crítica a vermelho; região controle a verde) e b) SNRPN (região crítica a vermelho; região controle a verde), para a região 15q11.2, do paciente 5, mostrando uma triplicação da região 15q11.2. A seta indica a hibridização com as sondas no cromossoma com a triplicação.	77
Figura 29: Caso 6: a) Cariótipo com bandas GTG, sem alterações estruturais na região proximal nos cromossomas 15 do par de homólogos. b) Par de homólogos 15 sem alteração da região proximal.....	79
Figura 30: Caso 6: Hibridização pela FISH da região 15q11.2, com duas sondas, tanto em metafase (a-b), como em interfase (c-d), mostrando uma duplicação com a) sonda UBE3A, b) sonda SNRPN, c) sonda UBE3A e d) sonda SNRPN. A seta indica a hibridização com as sondas no cromossoma com a duplicação.	79
Figura 31: Caso 7: Cariótipo com bandas GTG, sem alterações estruturais na região proximal dos cromossomas 15.	82
Figura 32: Caso 7: FISH em metafase com as sondas a) UBE3A (região crítica a vermelho; região controle a verde) e b) SNRPN (região crítica a vermelho; região controle a verde), para a região 15q11.2, do paciente 7, sem qualquer alteração para esta região. A seta indica a hibridização com as sondas.....	82
Figura 33: Representação esquemática do mecanismo das triplicações intersticiais 15q11-q13. Este mecanismo envolve uma troca do tipo U entre três cromátídeos: uma troca do tipo U entre os cromátídeos homólogos, no ponto de quebra distal, e a outra troca ocorre no ponto de quebra proximal. Pode envolver os cromátídeos irmãos, aqui representados, bem como os cromátídeos homólogos. O derivativo acêntrico pode perder-se. Cada cópia da região 15q11-q13 é orientada por uma seta, nos cromátídeos.	91
Figura 34: Representação esquemática da região 15q11-q13, com a localização das sondas usadas na FISH e das sondas usadas no MLPA, e com a extensão das alterações cromossômicas encontradas por MLPA.	92

Índice de tabelas

Tabela I: Genes candidatos para a susceptibilidade ao autismo.....	24
Tabela II: SALSA MLPA ME028 <i>Prader-Willi/Angelman Probemix</i> . Este kit possui 32 sondas específicas para sequências localizadas perto ou na região crítica para PWS e AS. Destas, cinco contêm sítios que são reconhecidos pela enzima HhaI (caixas a vermelho), catorze estão localizadas fora da região crítica e servem como controlo (caixas a verde), e três indicam a digestão completa pela HhaI (caixas a azul).....	55
Tabela III: Resumo das anomalias cromossômicas encontradas e correspondente quadro clínico dos pacientes. GTG: análise citogenética por bandagem G; FISH: <i>Fluorescent in situ Hybridization</i> ; MS-MLPA: <i>Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	61
Tabela IV: Resultados do paciente 2, com triplicação dos <i>loci</i> TUBGCP5, NIPA1, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 na região 15q11-q13, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente com duplicação (paciente 6) e de um paciente normal (paciente 20).	68
Tabela V: Resultados de MLPA, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028, a) do paciente 3, com o anel supranumerário para os <i>loci</i> TUBGCP5, MKRN3, MAGEL2 e NDN na região 15q11-q13, b) da mãe deste paciente, em que todas as sondas apresentam um padrão normal.	72
Tabela VI: Resultados de MLPA, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028, em que todas as sondas apresentam um padrão normal, tanto no irmão (a) como na mãe (c) e do paciente 4 (b), em que as sondas para os <i>loci</i> , MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 estão duplicados.....	75
Tabela VII: Resultados do paciente 5, com triplicação dos <i>loci</i> TUBGCP5, CYFIP1, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A, GABRB3, OCA2 e APBA2 na região 15q11-q13, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente normal (Paciente 12).....	78
Tabela VIII: Resultados do paciente 6, com duplicação dos <i>loci</i> MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 na região 15q11-q13, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente normal (Paciente 52).....	80
Tabela IX: Resultados de MLPA, utilizando o <i>kit</i> SALSA ME028 do paciente 7 (a) e da sua mãe (b), em que as sondas para os <i>loci</i> TUBGCP5 e NIPA1 estão duplicados..	83

Tabela X: Resultados de MLPA do feto da mãe do paciente 7, (linhas A e B), utilizando o *kit* SALSA ME028, em que todas as sondas apresentam um padrão normal.

..... 84

Tabela XI: Resumo dos casos em que foram encontradas discrepâncias de resultados entre as técnicas de FISH e MS-MLPA. 95

Resumo

O autismo trata-se de uma síndrome comportamental complexa, em que o paciente apresenta dificuldades de interação social e de comunicação, assim como comportamentos repetitivos e estereotipados, havendo uma prevalência de cerca de 34/10000 indivíduos.

Nesta patologia, os factores genéticos representam um papel importante, não se sabendo ainda quais os genes associados, no entanto, existem determinadas regiões cromossómicas mais susceptíveis, como por exemplo, a região proximal do braço longo do cromossoma 15 (15q11-q13).

Aproximadamente, 1% a 4% das crianças que têm autismo apresentam anomalias citogenéticas nesta região. Como a citogenética convencional apenas detecta deleções ou duplicações com tamanho entre 3-5 Mb é necessário recorrer a técnicas de citogenética molecular, como a *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH), que tem sido amplamente usada na detecção de anomalias cromossómicas em pacientes autistas. Recentemente, têm surgido novas metodologias, como a *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) que tem vindo a responder às necessidades exigidas pelos novos avanços da ciência.

O objectivo deste trabalho foi relacionar o autismo com alterações cromossómicas na região 15q11.2, e assim, avaliar a sua frequência na etiologia do autismo. Dos 556 casos autistas que foram referenciados ao laboratório, 429 foram estudados pela metodologia de FISH com as sondas para os *loci* SNRPN e UBE3A. Desses, 134 foram ainda analisados pela técnica de *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) com o *kit* ME028. Dos 429 casos, foram encontradas um total de 7 alterações: duas duplicações intersticiais da região 15q11-q13, duas triplicações intersticiais desta mesma região, um cromossoma supranumerário derivado do cromossoma 15, um marcador do cromossoma 15 em mosaico, e uma microduplicação localizada na região entre os pontos de quebra BP1 e BP2.

A frequência destas anomalias cromossómicas neste estudo (1,6%) está dentro da variabilidade reportada noutros trabalhos e são uma causa significativa para a etiologia do autismo. Estas descobertas indicam que a MS-MLPA é um método eficiente para o *screening* deste tipo de anomalias cromossómicas, sendo um método simples, rápido,

sensível e económico, permitindo a detecção simultânea de alterações no número de cópias e nos padrões de metilação.

Palavras-chave: Autismo; Cromossoma 15; PW/ASCR; anomalias cromossómicas da região 15q11-q13; FISH; MLPA.

Abstract

Autism is a complex behavioral syndrome, in which the patient presents deficit in social interaction and communication and has stereotyped and repetitive behaviors. Autism has a prevalence of 34/10000 individuals.

In this pathology, genetic factors play a significant role, and although the autism associated genes are not yet known, there are chromosomes regions such as the proximal region of the long arm of the chromosome 15 (15q11-q13) that share a certain susceptibilities.

Approximately 1 to 4% of the children who have autism present cytogenetic abnormalities in this region. As the conventional cytogenetic methods only detect deletions or duplications of 3-5 Mb in size, researchers usually use molecular cytogenetic techniques such as the Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) to evaluate them. Recently, new methodologies have arise such as the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), which has several advantages in the diagnosis of such chromosomal abnormalities.

The aim of this work was to find an association between autism and chromosomal alterations in the 15q11.2 region and to evaluate its prevalence in the autism etiology. 556 cases of autism have been reported to the laboratory. 429 were studied by FISH technique with probes to the SNRPN and UBE3A loci. Of these, 134 were analyzed by Methylation-Specific Multiplex ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) technique with the ME028 kit. Of the 429 cases, we found two interstitial duplications and two interstitial triplications in the region 15q11-q13, one supernumerary marker chromosome derived from chromosome 15, one supernumerary mosaic marker chromosome 15 and a microduplication of the region between breakpoint BP1 and breakpoint BP2.

The frequency of these chromosomal abnormalities in this study (1,6%) is within the reported frequencies in other studies. These findings also showed that the MS-MLPA is an efficient method for the screening of this type of chromosomal abnormalities, being simple, rapid, sensitive, economic and allowing the simultaneous detection of copy number alterations as well as methylation patterns.

Keywords: Autism; Chromosome 15; PW/ASCR; chromosomal abnormalities in 15q11-q13 region; FISH; MLPA.

1-Introdução

1-Introdução

1.1 – Definição da desordem autista

A expressão “autismo” foi utilizada pela primeira vez por Bleuler em 1911, para designar a perda de contacto com a realidade, o que implicava uma grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação (Gadia, *et al.*, 2004).

Leo Kanner, em 1943, usou a mesma expressão para descrever onze crianças que tinham em comum um comportamento bastante original, e que nos dias de hoje, ainda é aceite como um fenótipo típico de autismo. Sugeriu que se tratava de uma incapacidade inata para estabelecer contacto afectivo e interpessoal, e que era uma síndrome bastante rara, mas provavelmente mais frequente do que o esperado, pelo número de casos diagnosticados. Em 1944, Asperger descreveu casos em que havia algumas características semelhantes ao autismo, em relação às dificuldades de comunicação social em crianças com inteligência normal (Gadia, *et al.*, 2004; Steyaert e Marche, 2008).

O espectro autista trata-se de uma síndrome comportamental complexa, começando antes dos três anos de idade, permanecendo durante toda a vida, em que o paciente apresenta dificuldades de interação social e de comunicação, assim como, comportamentos repetitivos e estereotipados. (Andres, 2002; Silva *et al.*, 2002; Reddy, 2005; Martin e Ledbetter, 2007; Steyaert e Marche, 2008; Abrahams e Geschwind, 2008).

O autismo pode ser classificado através de um espectro de fenótipos neurocomportamentais referidos como espectro das desordens autistas (ASD), que além desta síndrome, inclui ainda, a desordem de *Asperger*, a doença de *Rett*, as desordens desintegrativas da infância e as alterações de comportamentos subtis sem outras especificações, também designado por autismo atípico (Muhle *et al.*, 2004; Schanen, 2006; Martin e Ledbetter, 2007).

1.2 – Epidemiologia

Os primeiros estudos de prevalência do autismo reportavam para taxas de cerca de 4-5/10000 casos (Steyaert e Marche, 2008). No entanto, estudos recentes demonstraram

que este número tem aumentado dramaticamente nos últimos 20 anos, para uma taxa de prevalência de cerca de 34/10000 crianças. A causa deste aumento ainda permanece controversa, embora, os especialistas concordem que este se deve a um melhor conhecimento da doença, assim como, dos critérios de diagnóstico definidos para as ASD (Martin e Ledbetter, 2007; Steyaert e Marche, 2008). Vários estudos reportam uma predominância sexual de 4:1 entre homens e mulheres, respectivamente (Andres, 2002; Silva *et al.*, 2002; Martin e Ledbetter, 2007; Steyaert e Marche, 2008).

Até 1990, as ASD eram raramente diagnosticadas em Portugal. Hoje em dia, são usados diversos critérios de diagnóstico, que têm demonstrado uma taxa de prevalência de cerca de 10/10000 crianças. Características genéticas da população ou factores ambientais da região podem contribuir para a discrepância encontrada na prevalência estimada noutros estudos. (Oliveira *et al.*, 2007).

1.3 – Genética do autismo

Apesar de extensas investigações na etiologia do autismo englobarem diversas áreas, incluindo a de genética, ambiental, neuroimagem, patológicas e farmacológicas, esta patologia ainda permanece desconhecida, uma vez que é mais complexa do que uma simples desordem Mendeliana de um único gene, e está associada a vários mecanismos genéticos possíveis. Esta síndrome não tem um padrão de segregação simples indicativo de um autossoma dominante ou de uma hereditariedade recessiva (Martin e Ledbetter, 2007; Bartlett *et al.*, 2005; Andres, 2002).

Vários investigadores, incluindo Kanner e Asperger, entre 1960 e 1970 sugeriram anomalias biológicas associadas à doença. A partir de 1970, as alterações genéticas foram vistas como a principal predisposição para a doença (Steyaert e Marche, 2008).

Estudos da história familiar e de gémeos demonstraram que os factores genéticos desempenham um papel importante nesta doença. A incidência do autismo é 50-100 vezes maior na população com história familiar de autismo, quando comparada com a população em geral, e a taxa de concordância nos gémeos monozigóticos é cerca de 60%, em contraste com os gémeos dizigóticos, onde a taxa é quase nula. O facto da taxa de concordância em gémeos monozigóticos não ser de 100% parece demonstrar alguma participação de factores ambientais (Chen *et al.*, 2007; Andres, 2002). Estas descobertas sugerem uma complexa hereditariedade no autismo, e é possível que diferentes genes e

o contributo de diferentes vias biológicas levem ao fenótipo das desordens do espectro autista (Steyaert e Marche, 2008).

O fenótipo autista é provavelmente, causado por muitos mecanismos genéticos diferentes, onde podem estar envolvidos um ou mais genes, ou efeitos ambientais. O autismo idiopático pode ser explicado por factores genéticos, incluindo desordens onde está envolvido um único gene, síndromes genéticas, desordens multigénicas e desequilíbrios genómicos (Martin e Ledbetter, 2007; Christian *et al.*, 2008). A interacção de factores genéticos e ambientais corresponde à maioria das doenças humanas, designadas por doenças complexas, como é o caso do autismo (Andres, 2002).

1.3.1-Endofenótipos

Como a heterogeneidade biológica e genética das ASD vem sendo mais óbvia, houve necessidade de criar um novo conceito, “endofenótipo”, que veio desvendar a neurobiologia das ASD e facilitar a pesquisa de genes candidatos ao autismo. Endofenótipos são pequenos grupos relacionados com sintomas comportamentais que representam hipoteticamente um subgrupo genético e/ou mecanismos patofisiológicos envolvidos no fenótipo total (Dykens *et al.*, 2004; Steyaert e Marche, 2008).

Pesquisas endofenotípicas em pacientes com ASD que possuem heterogeneidade genética podem ser subdivididos em grupos que têm como base as características neurocognitivas ou biológicas que estão compreendidas entre o fenótipo e o genótipo (Steyaert e Marche, 2008).

1.4- Epigenética do autismo

Muitos investigadores, propõem agora, que 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).

As alterações epigenéticas que incluem a metilação de citosinas e as modificações pós-transduracionais de histonas providenciam um mecanismo para a modulação da expressão de genes, que podem ser influenciadas pela exposição a factores ambientais e

mostrar efeitos de origem parental. O envolvimento de factores genéticos nas ASD é demonstrado pelo papel central dos mecanismos epigenéticos reguladores na patogénese das síndromes de *Rett* e de X-frágil (Schanen, 2006).

A metilação do DNA envolvida em processos de *imprinting* resulta de eventos epigenéticos implicados em muitos processos celulares. Estes incluem a expressão genética específica do desenvolvimento e de tecidos, a expressão genética da origem parental (*imprinting*) e inactivação do cromossoma X. A metilação normalmente ocorre em nucleótidos de citosina localizados nas ilhas CpG, uma sequência promotora desse gene, resultando no silenciamento transcripcional (Bittel *et al.*, 2007).

O *imprinting* genómico é o exemplo clássico da regulação da expressão génica via modificações epigenéticas que levam à expressão génica específica da origem parental. Em adição, um crescente número de genes que não sofrem *imprinting* são regulados por metilação do DNA, incluindo a *Reelin* (RELN) que tem sido considerada como uma candidata para o autismo (Schanen, 2006).

1.5- A procura de genes candidatos

Diversas técnicas experimentais e modelos patofisiológicos têm sido usados para identificar os genes candidatos, (Figura 1) nomeadamente o *screening* de todo o genoma, que permite identificar marcadores genéticos nas populações de várias famílias com autismo. A pesquisa de genes envolvidos em doenças complexas também pode ser feita por análise citogenética que procura alterações genéticas herdadas ou *de novo*, correspondentes a translocações, deleções, duplicações e regiões reguladoras envolvidas na etiologia da doença (Muhle *et al.*, 2004). A frequência de tais anomalias na população autista pode ser estimada em cerca de 3% (Andres, 2002).

Investigações adicionais referem estudos de *linkage disequilibrium*, em que se procuram as regiões identificadas pela análise citogenética ou pelo *screening* do genoma (Muhle *et al.*, 2004). Estudos de associação tentam detectar ou quantificar a correlação entre dois *loci*. Este tipo de estudos com genes candidatos sugeriu o envolvimento do sistema serotoninérgico e glutamatérgico, entre outros, no desenvolvimento da doença. Contudo, estudos de associação apresentam limitações, pois requerem a pré-existência de hipóteses acerca do envolvimento do sistema biológico, o que é muito limitado na síndrome autista (Steyaert e Marche, 2008).

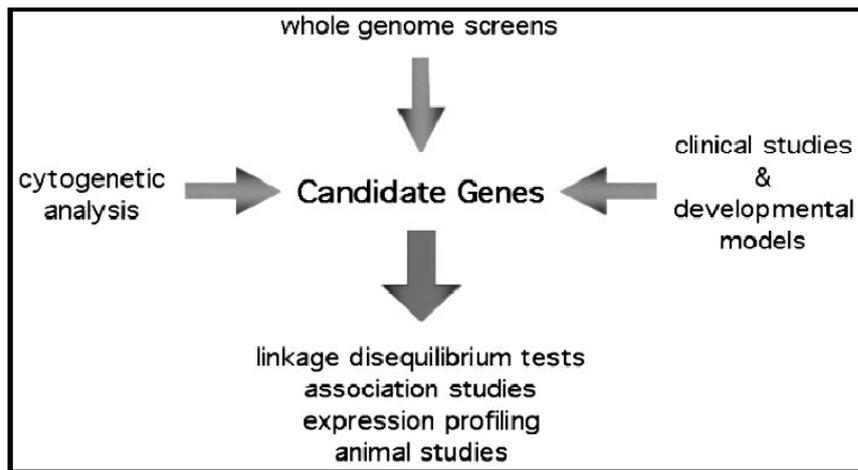


Figura 1: Técnicas utilizadas na pesquisa de genes candidatos ao autismo. Os investigadores usam diversas técnicas experimentais e modelos patofisiológicos do autismo para identificar os genes candidatos (Muhle *et al.*, 2004).

O principal objectivo de todas as técnicas é identificar mutações genéticas hereditárias em genes candidatos que predisponham um indivíduo ao autismo. Genes candidatos que estão envolvidos na causa do autismo são genes cujo produto é conhecido por desempenhar um papel no desenvolvimento do cérebro ou estar associado a estruturas cerebrais, neurotransmissores ou neuromoduladores implicados no autismo (Muhle *et al.*, 2004).

Estes estudos têm tido sucesso na identificação da causa genética para o autismo, em pelo menos 10% a 15% dos indivíduos com ASD. Rearranjos cromossômicos desequilibrados representam a maior proporção de casos de autistas identificados por análise de bandagem GTG (Martin e Ledbetter, 2007).

1.6- Os *loci* candidatos

Apesar de ainda não se saber muito bem quais os genes associados a esta patologia, algumas regiões cromossômicas têm sido associadas com as desordens do espectro autista, num número substancial de pacientes. Regiões implicadas por múltiplos estudos incluem 1p; 2q32; 3p25-p26; 4q; 5q; 6q21; 7q22; 7q31-q33; 8q22-24; 10q; 11q; 13q; 15q11-q13; 16p13; 17q; 18q; 19p; 22q; Xq (Tabela 1). No entanto, diversos estudos demonstraram que a região cromossômica de maior susceptibilidade

para o autismo é a 15q11-q13. (Muhle *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2007; Bauman e Kemper, 2005; Abrahams e Geschwind, 2008).

Tabela I: Genes candidatos para a susceptibilidade ao autismo. (Adaptado de Bauman e Kemper, 2005).

Loci candidatos	Genes candidatos
1p	_____
2q32	DLX1/DLX2; SCRT;
3p25-p26	OT Receptor
4q	_____
5q	_____
6q21	GRIK2/GLUR6
7q22	RELN; NPTX2; HOXA1
7q31-q33	FOXP2; IMMPL2; ST7/RAY1; WNT2; MEST
8q22-24	CSMD3
10q	PTEN
11q	SHANK2
13q	_____
15q11-q13	GABA_A; UBE3A
16p13	NMDAR; TSC2
17q	SLC6A4; NF1; HOXB1
18q	_____
19p	_____
22q	_____
Xq	MECP2; NLGN4

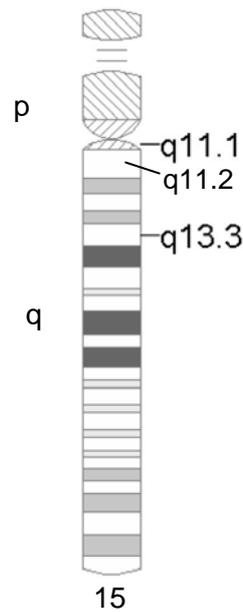
Muitos destes rearranjos citogenéticos foram primeiramente detectados pela análise citogenética com bandagem GTG, no entanto, este método de análise é limitado pela sua resolução de aproximadamente, 3 a 5 Mb (Martin e Ledbetter, 2007). Alterações cromossômicas visíveis citogeneticamente (>3 Mb) são identificadas em 3% a 6% dos indivíduos afectados (Depienne *et al.*, 2009). Deste modo, desequilíbrios genómicos inferiores a este tamanho não podem ser detectados, o que fez com que houvesse a procura de métodos de alta resolução para identificar ganhos ou perdas de material cromossômico. Técnicas como a *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) permitiram um aumento na resolução, usando sondas de DNA específicas para um determinado *locus* (aproximadamente 50 a 100 kb), (Martin e Ledbetter, 2007).

Mais recentemente, metodologias como a *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) e o *array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) têm sido utilizadas como técnicas de citogenética molecular poderosas que são mais eficientes e oferecem uma maior resolução na identificação de ganhos ou perdas, quando comparadas com técnicas de banda G ou FISH, uma vez que permitem um *screening* mais alargado do genoma. (Martin e Ledbetter, 2007; Christian *et al.*, 2008). O aCGH tem revelado desequilíbrios genómicos em pelo menos 10% dos indivíduos autistas (Depienne *et al.*, 2009).

1.6.1- Região cromossómica 15q11-q13

A região cromossómica 15q11-q13 tem sido identificada como a região de maior susceptibilidade ao autismo. Esta, localizada na região proximal do braço longo do cromossoma 15 (Figura 2 a), é extremamente complexa e instável, devido à presença de elementos de DNA repetidos, também conhecidos como *low copy repeats* (LCRs) que flanqueiam esta região, estando deste modo, sujeita aos mais diversos rearranjos moleculares, como é o caso de translocações, inversões, duplicações, triplicações, formação de marcadores supranumerários e deleções de aproximadamente 4 Mb, associadas tanto às síndromes de *Prader-Willi* (PWS), como de *Angelman* (AS), de acordo com a origem parental (paternal e maternal, respectivamente), (Figura 2 b), (Maggouta *et al.*, 2003; Battaglia, 2008; Kwasnicka-Crawford *et al.*, 2007). Este efeito da origem parental é resultado de um fenómeno epigenético, designado por *imprinting* genético (activação diferencial de genes, dependendo do progenitor do qual eles são herdados), (Browne *et al.*, 1997; Battaglia, 2005; Hogart *et al.*, 2008a; Ungaro *et al.*, 2001).

a) Ideograma do cromossoma 15



b)

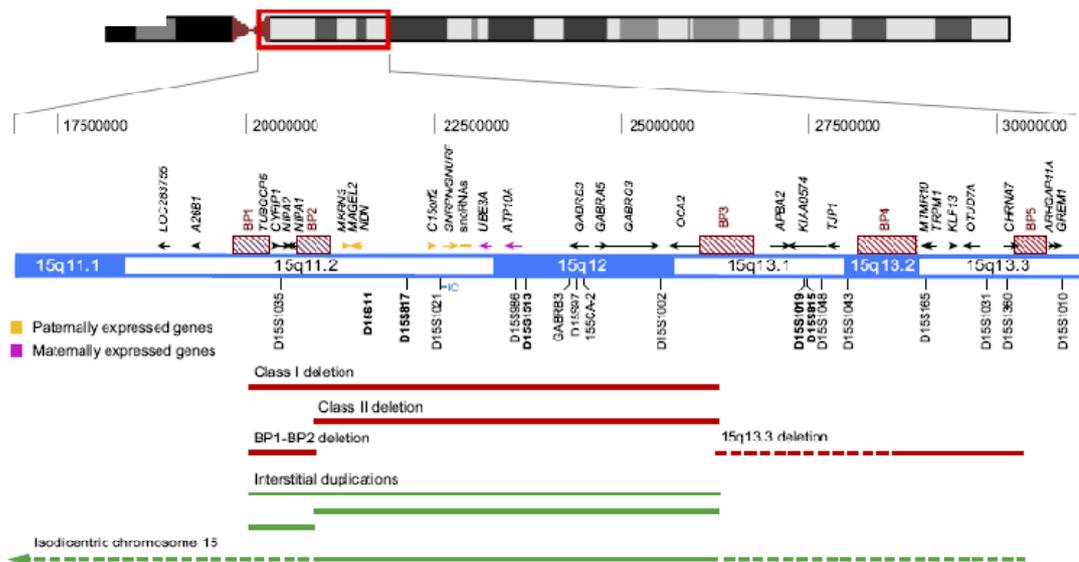


Figura 2: a) Representação esquemática da região 15q11-q13, associada ao autismo, localizada no braço longo do cromossoma 15. b) Mapa do cromossoma 15, indicando a região crítica para as síndromes de PWS e AS, localizada entre os pontos de quebra BP2 e BP3. Os genes presentes nesta região estão representados no mapa. Os genes de expressão paterna estão indicados a amarelo e os de expressão materna a rosa. Os pontos de quebra estão indicados nas caixas roxas. Os traços vermelhos indicam as regiões delectadas nas síndromes de PWS/AS. Os traços verdes indicam as regiões envolvidas nas duplicações intersticiais e nos cromossomas isodicêntricos supranumerários, associadas ao autismo (Adaptado de Depienne *et al.*, 2009).

A região 15q11-q13 é constituída por um grande domínio proximal (~2 Mb) de genes de expressão paterna, por um pequeno domínio com genes de expressão materna (MED: ~500 kb), e por uma grande região distal (~2 Mb), aparentemente, de expressão bialélica (Kato *et al.*, 2008). O controlo coordenado do *imprinting* genético por toda a região é mediado por um centro de *imprinting* (IC) no promotor SNRPN. O MED contém dois genes de *imprinting*, de expressão materna, os genes UBE3A e ATP10C (Figura 3), (Kato *et al.*, 2008).

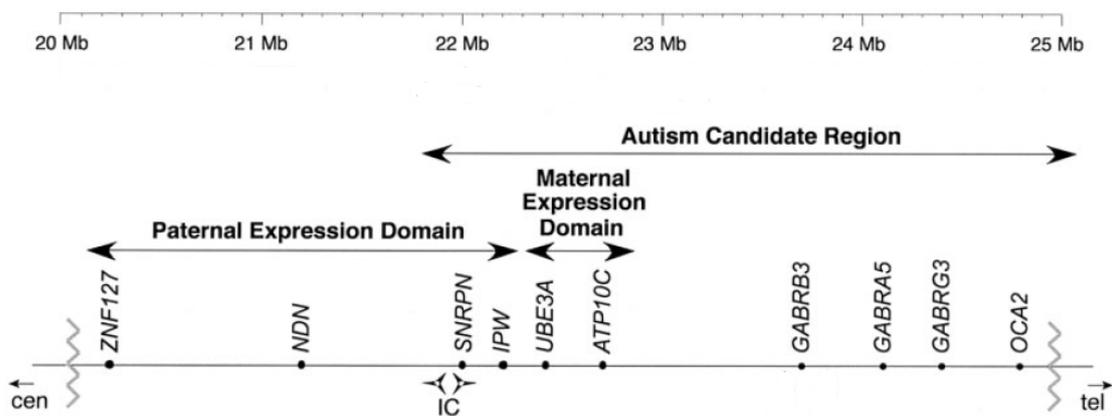


Figura 3: Representação esquemática da região 15q11-q13 e do domínio de expressão materna (MED). As regiões delimitadas pelas setas indicam os genes de expressão paterna, os genes de expressão materna e a região associada ao autismo. O esquema mostra a localização dos genes e do centro de *imprinting*. (Adaptado de Dykens, *et al.*, 2004).

Um desalinhamento durante a meiose I, nas LCRs 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 predis põem o cromossoma 15 a rearranjos genómicos (Figura 2 b), (Hogart *et al.*, 2008a e b).

Aproximadamente, 1% das crianças que têm autismo apresentam anomalias citogenéticas na região cromossómica 15q11-q13, sob a forma de duplicações intersticiais ou de cromossomas marcadores supranumerários formados pela duplicação invertida do cromossoma 15q proximal. Esta é também a região crítica das síndromes de PWS e AS (Keller, *et al.*, 2003; Martin e Ledbetter, 2007; Battaglia, 2008).

Duplicações e triplicações intersticiais

A deleção associada às síndromes de PWS e AS é uma das mais comuns nos seres humanos, onde se identificam, pelo menos, três *hotspots* para as quebras na região 15q11-q13, referidos como BP1, BP2 e BP3 (Figura 2b), (Ungaro *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002).

As duplicações intersticiais da região 15q11-q13 podem ser divididas em duas categorias em que, uma não contém a região crítica de *Prader-Willi/Angelman* e parece não ter efeitos clínicos, e a outra inclui a região crítica para as síndromes de PWS e AS (Bolton *et al.*, 2001).

A literatura refere que duplicações intersticiais da região 15q11-q13 de origem materna têm sido identificadas em pacientes com atraso de desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem e comportamentos autistas, pensando-se que o gene candidato mais provável é o UBE3A ou o seu vizinho de *imprinting* o ATP10A, enquanto que pacientes com duplicações herdadas do pai apresentam um fenótipo normal (Ungaro *et al.*, 2001). Frequentemente, as duplicações abrangem toda a região crítica das síndromes PWS/AS. A extensão distal de duas duplicações maternas foi situada entre S12 e S24 em BP3 (Figura 4 a e b), enquanto que o ponto de quebra proximal está localizado em BP2 (Figura 2 b), (Ungaro *et al.*, 2001). A análise destes dois casos sugeriu a existência de um mecanismo comum para estas anomalias, assim é possível que alterações resultantes de um *crossing-over* desigual na meiose e que deleções e duplicações sejam produtos recíprocos (Repetto, 2001).

Alguns estudos demonstraram que duplicações herdadas do pai também podem levar a efeitos no fenótipo, incluindo o autismo. Estes podem ter outros factores como genéticos, e ou ambientais/epigenéticos que podem operar de forma a modificar a penetrância e a expressividade da duplicação paterna (Depienne *et al.*, 2009).

As características mais comuns associadas a triplicações intersticiais, quer as de origem materna, quer as de origem paterna, parecem estar associadas com fenótipos do neurodesenvolvimento mais severos que incluem o atraso no desenvolvimento e na linguagem, hipotonia, e fenótipos anormais. A extensão distal das triplicações está localizada em S1043, (Figura 4 a e b) enquanto que a extensão proximal é desconhecida (Ungaro *et al.*, 2001; Hogart *et al.*, 2008a).

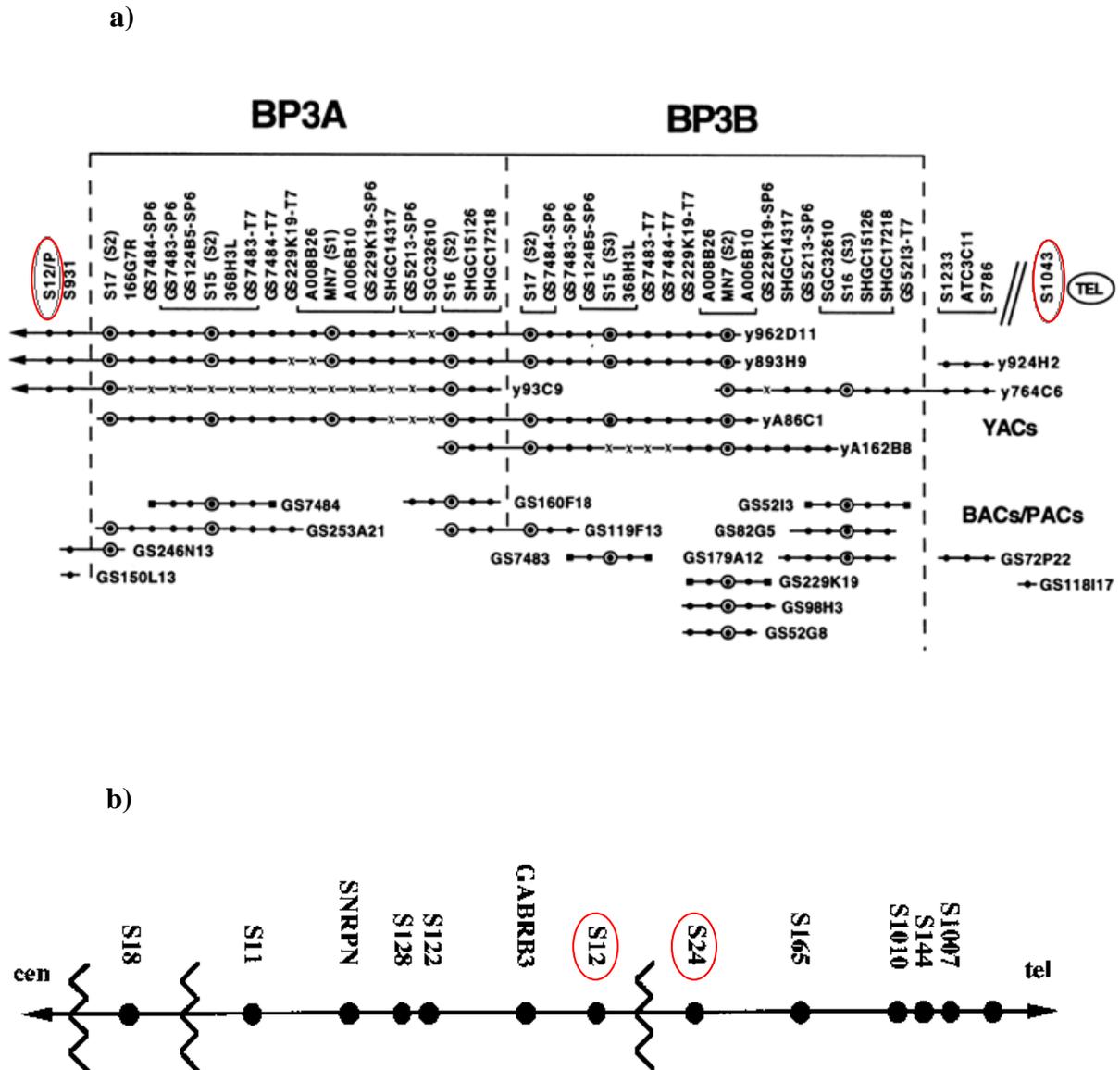


Figura 4: a) Representação esquemática que mostra o mapa do ponto de quebra BP3A/BP3B (Adaptado de Christian *et al.*, 1999). b) Parte do ponto de quebra BP3, que mostra a extensão distal das duplicações maternas entre S12 e S24 (Adaptado de Wandstrat *et al.*, 1998).

Cromossomas marcadores

Cromossomas marcadores supranumerários (SMC) são cromossomas estruturalmente alterados que são extra ao complemento normal de 46 cromossomas. Aproximadamente, 70% surgem *de novo*, em que 20% são herdados da mãe e cerca de

10% herdados do pai (Dennis *et al.*, 2006). À volta de 70% de todos os SMC são derivados de autossomas acrocêntricos, em que metade derivam do cromossoma 15 (Dennis *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2003). Cromossomas marcadores supranumerários derivados do cromossoma 15 foram descritos pela primeira vez por Van Dyke e seus colaboradores em 1977 (Van Dyke *et al.*, 1977).

A grande maioria de SMC(15) é bissatélite e dicêntrica, contendo uma quantidade variável de material 15q entre os 2 centrómeros. Estes podem ser chamados de cromossomas isodicêntricos [idic(15)] ou de duplicações invertidas [inv dup(15)] e ocorrem com uma frequência de 1/5000 (Ungaro *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2003; Kwasnicka-Crawford *et al.*, 2007).

Os SMC(15) podem ser divididos em dois subgrupos baseados na presença ou ausência da região crítica para PWS e AS. Um grupo é conhecido como o SMC(15) pequeno, que é metacêntrico ou submetacêntrico, heterocromático e não contém a região crítica para as síndromes de PWS e AS (PW/ASCR), sendo citogeneticamente descrito como dic(15)(q11). Este grupo de inv dup(15) tem pontos de quebra BP1 ou BP2, com limites proximais para a região crítica para PWS e AS (Figura 2 b). Estes são frequentemente de origem familiar e não têm qualquer efeito clínico conhecido, a não ser quando a sua origem é *de novo*, com disomia uniparental (UPD) do cromossoma 15 e quando existe uma possível associação com a infertilidade masculina, na presença de duas cópias (Dennis *et al.*, 2006; Battaglia, 2005; Battaglia, 2008; Kwasnicka-Crawford *et al.*, 2007).

O outro grupo é o dos SMC(15) grandes que inclui a região crítica para PWS e AS, (Figura 2 b), são eucromáticos quase sempre esporádicos e de origem materna, sendo a sua descrição citogenética dic(15)(q12 ou q13), (Battaglia, 2005; Battaglia, 2008; Kwasnicka-Crawford *et al.*, 2007). Normalmente, incluem duas cópias da região crítica para PWS e AS em orientações opostas (Dennis *et al.*, 2006). O limite distal dos grandes cromossomas inv dup(15), aparentemente, envolve quatro pontos de quebra diferentes, um equivalente ao ponto de quebra da região delectada em PWS/AS (BP3), um localizado entre GABRB3 e D15S12, e outros dois distais a D15S1043 (Figura 5), (Ungaro *et al.*, 2001).

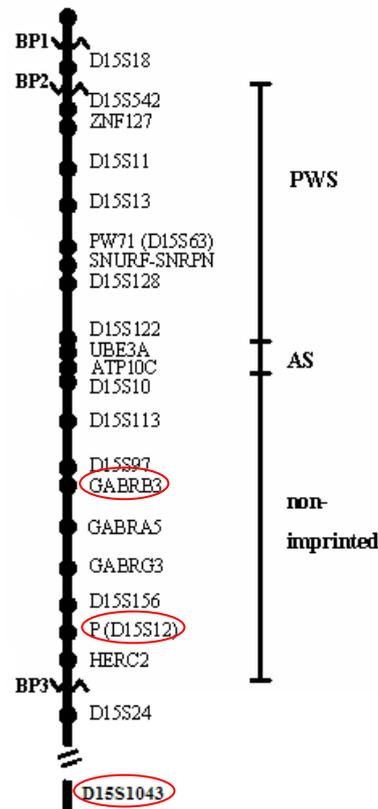


Figura 5: Representação esquemática da região 15q11-q13, associada ao autismo com os *hotspots* para as deleções (BP1, BP2 e BP3), e os quatro pontos de quebra diferentes: um associado ao ponto de quebra da região delectada em PWS/AS (BP3), um localizado entre GABRB3 e D15S12, e outros dois distais a D15S1043 (Adaptado de Ungaro *et al.*, 2001).

As características clínicas associadas com os SMC(15) grandes são: hipotonia, atraso motor e da fala, deficiência severa ou moderada da aprendizagem, epilepsia, características dismórficas e autismo (Ungaro *et al.*, 2001; Dennis *et al.*, 2006).

Tetrasomias da região crítica das síndromes de PWS/AS observaram-se em pacientes com cromossomas, inv dup(15), (Ungaro *et al.*, 2001). O facto da tetrasomia da região crítica para PWS e AS estar associada com um fenótipo mais severo do que o observado em trisomias, sugere que o número de genes presentes nas alterações influencia o fenótipo. Alterações herdadas da mãe mostram ser patogénicas. É possível que genes maternos nesta região genómica actuem de uma maneira dependente do número de genes presentes, e que o seu número de cópias é crítico para o desenvolvimento e funções normais do cérebro (Hogart *et al.*, 2008a).

Segue-se uma descrição breve dos genes que podem surgir com expressão alterada nas deleções e duplicações da região 15q11-q13.

UBE3A

A expressão materna do UBE3A codifica uma ubiquitina E3 ligase que transfere moléculas directas de ubiquitina, a partir da via E1 e E2 para substratos específicos e é predominantemente expressa no cérebro humano, sendo regulada por mecanismos complexos que envolvem mecanismos de *imprinting* (Hogart *et al.*, 2008a; Muhle *et al.*, 2004; <http://www.ensembl.org>).

Mutações que levam à perda de função da UBE3A ou deficiências devido a deleções de origem materna ou de mutações de *imprinting* causam AS. Mostrou-se que a UBE3A é activamente transcripta a partir de duplicações cromossómicas em linfócitos, e a sobreexpressão da UBE3A é também observada em amostras de linfoblastos com duplicação materna da região 15q11.2-q13. Estes resultados sugerem que o aumento da expressão da UBE3A pode ocorrer no cérebro destes pacientes, mas as consequências fenotípicas ainda não estão claras (Hogart *et al.*, 2008a).

ATP10A

O gene ATP10A está compreendido a 200 kb dos telómeros para a UBE3A e codifica uma ATPase humana transportadora de aminofosfolipidos, que quando delectada na mãe, os ratinhos desenvolvem obesidade e diabetes tipo 2. Em humanos, é proposto que a ATP10A tenha um *imprinting* semelhante à UBE3A. Alguns estudos de associação genética sugerem que a ATP10A pode contribuir para o autismo, não havendo concordância quanto aos resultados (Hogart *et al.*, 2008a; Schannen, 2006; <http://www.ensembl.org>).

SNRPN e snoRNAs

O *locus* do SNRPN na região 15q11.2-q13 codifica transcriptos de *imprinting* de expressão paterna altamente complexos. A zona terminal 5' do SNRPN contém um centro de *imprinting* que permite distinguir o cromossoma paterno do cromossoma materno, através da metilação diferencial do DNA. Duas pequenas proteínas, a SNURF

(SNRPN *upstream reading frame*) e a SmN (*Small nucleoprotein N*) codificadas pelo exão 5' têm uma influência mínima nos fenótipos de PWS. O *splicing a downstream* dos exões não codificantes produz várias classes de pequenos RNAs nucleares (SnoRNAs) que parecem estar envolvidos no processamento de mRNA, de genes relevantes para o receptor 2C da serotonina. Alterações neste gene parecem contribuir para fenótipos de PWS (Hogart *et al.*, 2008a; <http://www.ensembl.org>).

NECDIN e MAGEL2

Os genes NECDIN (NDN) e MAGEL2 pertencem à mesma família de genes, a NDN/MAGE, e estão relacionados com os genes de *imprinting* de expressão paterna, principalmente em neurónios pós-mitóticos. Nenhum destes genes parece estar completamente associado ao fenótipo de PWS, no entanto, anomalias nestes genes, podem levar a efeitos em muitos processos neurológicos (Hogart *et al.*, 2008a).

O NDN desenvolve um papel crítico nas especificações dos neurónios inibitórios no cérebro, via interacção com a *distal-less 5* (DLX5), o produto de um gene de expressão materna que está localizado no cromossoma 7q, que tem sido implicado nas ASD (Schannen, 2006). O NDN também desempenha um papel na diferenciação e especificação dos neurónios GABAérgicos em cooperação com proteínas do homeodomínio DIX (Cai *et al.*, 2008).

O gene MAGEL2 está localizado próximo do *locus* NDN, sendo importante na regulação do ritmo circadiano relacionado com algumas características de PWS (Cai *et al.*, 2008). Este é transcrito a partir do alelo paterno e é expresso predominantemente no hipotálamo, tornando-se um forte candidato para a síndrome de PWS (Schannen, 2006).

Embora estes genes sejam fortes candidatos a PWS e potenciais candidatos funcionais nas ASD é difícil rectificar o aparente conflito entre as consequências das cópias extra dos genes de expressão paterna e o fenótipo autista de origem materna em síndromes dup(15). Contudo, dada a complexidade da regulação da expressão genética nesta região, é possível que duplicações no cromossoma materno levem indirectamente a erros de expressão dos genes paternos (Schannen, 2006).

MKRN3

O gene MKRN3 que codifica uma proteína *ring finger* é expresso exclusivamente, a partir do alelo paterno e pensa-se estar implicado em características clínicas de PWS, como os genes NDN e MAGEL2 (Cai *et al.*, 2008; <http://www.ensembl.org>).

Genes associados às subunidades do Receptor GABA_A

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro dos mamíferos, que se liga a receptores GABA_A pentaméricos ionotrópicos permeáveis a cloreto, inibindo a actividade eléctrica dos neurónios (Ouldim *et al.*, 2007; Hogart *et al.*, 2008a). A região 15q11.2-q13 contém três genes para as subunidades do receptor GABA_A, os genes, GABRB3, GABRA5 e GABRG3. Apesar dos genes GABA da região 15q11.2-q13 não sofrerem *imprinting*, há um aumento da severidade em pacientes com PWS e AS, em comparação com pacientes com UPD, o que sugere a implicação destes genes nestas doenças. Duplicações na região 15q11.2-q13 de origem materna na expressão do gene GABA no cérebro é normalmente desconhecida, contudo evidências genéticas e moleculares sugerem que alterações no GABRB3 podem contribuir para alterações neste cromossoma, associadas ao autismo (Hogart *et al.*, 2008a).

Alguns estudos mostram um papel do GABA na supressão da actividade funcional do seu receptor, conduzindo a comportamentos descontrolados e descoordenação motora. Wagner e seus colaboradores (1997) reportaram que o GABA também pode excitar neurónios maduros do hipotálamo, funcionando como um neurotransmissor inibitório à noite, e um neurotransmissor excitatório durante o dia. Este duplo efeito pode ser atribuído a oscilações na concentração intracelular do cloreto, assim um excesso de receptores do GABA podem levar a problemas comportamentais, tais como a hiperactividade e a epilepsia. Como é que os genes dos receptores GABA estão relacionados com o autismo, ainda não é muito claro, e os segmentos duplicados incluem muitos outros genes. (Wagner *et al.*, 1997). Contudo, Cook e colaboradores (1998) encontraram nove *loci* na região 15q11-q13 ligados ao autismo, os quais afectavam apenas o *locus* GABRB3 155CA-2.

TUBGCP5

O gene TUBGCP5 está localizado entre os pontos de quebra BP1 e BP2, fora da região crítica para as síndromes de PWS e AS, sendo expresso em níveis moderados no cérebro. Este gene desempenha um papel na nucleação dos microtúbulos, ao nível do centróssoma (<http://www.ensembl.org>).

CYFIP1

Este gene que está localizado fora da região crítica para PWS e AS, não sofre processos de *imprinting* e pode contribuir para o aumento da severidade observada em pacientes com deleções e duplicações maiores. O gene *Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1* (CYFIP1) também chamado de Sra-1 está situado no intervalo entre BP1 e BP2 e é particularmente importante no contexto das ASD. Este gene interage com genes associados à síndrome de X-frágil, nomeadamente o *cytoplasmic FMR interacting protein 1* (FMRP1), e com uma pequena GTPase, a Rac1, que está envolvida na regulação da migração axonal e morfologia da espinha dendrítica (Hogart *et al.*, 2008a. Depienne *et al.*, 2009). O CYFIP1 tem sido proposto como uma potencial ligação molecular entre a síndrome de X-frágil e as duplicações da região 15q11-q13, porque ambas as desordens resultam de um excesso do CYFIP1 livre (Depienne *et al.*, 2009).

NIPA1

O gene *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1* (NIPA1), à semelhança do gene anterior, também não sofre processos de *imprinting*. Está localizado entre os pontos de quebra BP1 e BP2 fora da região crítica para as síndromes de PWS a AS. Este gene desempenha um papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, e medeia o transporte de magnésio, o que indica que pode estar envolvido no controlo da homeostase celular do magnésio. Mutações neste gene estão associadas com a paraplegia espástica 6 (gene SPG6), uma doença autossómica dominante (<http://www.ensembl.org>).

APBA2

O gene APBA2 está localizado na região 15q13.1, fora da região crítica para as síndromes de PWS e AS. Este gene parece estar envolvido na exocitose sináptica, e interage com proteínas envolvidas na doença de Alzheimer. É um gene de susceptibilidade para a esquizofrenia (<http://www.ensembl.org>).

1.7- Tecnologias para o estudo da etiologia do autismo

Para a investigação da etiologia do autismo foram objecto de estudo pacientes referenciados com quadros específicos da doença. Foram executadas técnicas de citogenética convencional, de citogenética e biologia molecular, nomeadamente a *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) e a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

1.7.1 – Citogenética convencional

A Genética é uma Ciência Biológica que foi inicialmente usada para englobar conceitos de hereditariedade. A citogenética é um ramo da genética que se dedica ao estudo microscópico do número e da estrutura dos cromossomas e da sua relação com o fenótipo (Robertis e Robertis, 1987).

A palavra “cromossoma” foi introduzida por W. Waldeyer em 1888, significando em grego “corpo colorido”. Em 1875, Eduard Strasburger observou cromossomas de plantas, pela primeira vez, e só entre 1879-1889 é que Walther Flemming observou cromossomas em animais, tendo também criado palavras como *mitosis*, *chromatin*, *prophase*, *metaphase*, *anaphase* e *telophase* (Robertis e Robertis, 1987).

Painter, em 1923, definiu o cariótipo humano com 48 cromossomas, e durante três décadas pensou-se que este número estava correcto. Este erro deveu-se a problemas técnicos que dificultaram a contagem destas estruturas, nomeadamente a difícil separação dos cromossomas na célula, as diferenças pouco evidentes entre as constrições primárias, os centrómeros, e as constrições secundárias, as regiões de heterocromatina dos cromossomas e os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, associadas à dificuldade na obtenção de células em divisão (Barch *et al.*, 1997).

Em 1952, Hsu usou uma solução salina hipotônica durante alguns minutos antes da fixação dos cromossomas para obter um melhor espalhamento destes (Hsu, 1952). O uso da colchicina em culturas celulares foi introduzido por Ford em 1956, uma substância mitótica que permite bloquear as células em metafase, a fim de aumentar o número de metafases disponíveis para observação ao microscópio (Ford e Harmerton, 1956a,b). Estas experiências permitiram grandes avanços técnicos, tornando-se possível estabelecer o cariótipo humano nas células diplóides em 46 cromossomas (Tijo e Levan, 1956). Apesar destes avanços técnicos, mesmo corando os cromossomas com Giemsa, estes não apresentavam bandas, assim, eram agrupados de acordo com o seu tamanho e posição do centrómero. Contudo, mesmo face a estas limitações, foram identificadas as primeiras alterações numéricas (aneuploidias) responsáveis pelas doenças humanas (Barch *et al.*, 1997).

A área da citogenética evoluiu, mais uma vez, com a descoberta da *phytohemaglutinina* que é um agente mitogénico que estimula a divisão de linfócitos T *in vitro*, permitindo a obtenção de metafases a partir de sangue periférico. Caspersson e seus colaboradores, em 1968, introduziram a bandagem cromossômica que veio permitir identificar os cromossomas humanos segundo um padrão de bandas claras e escuras, específico de cada cromossoma, permitindo a realização do cariótipo humano (Figura 7). De seguida, foram desenvolvidos vários métodos de bandagem consoante o tipo de abordagem que se pretende fazer (Barch *et al.*, 1997; Smeets, 2004).

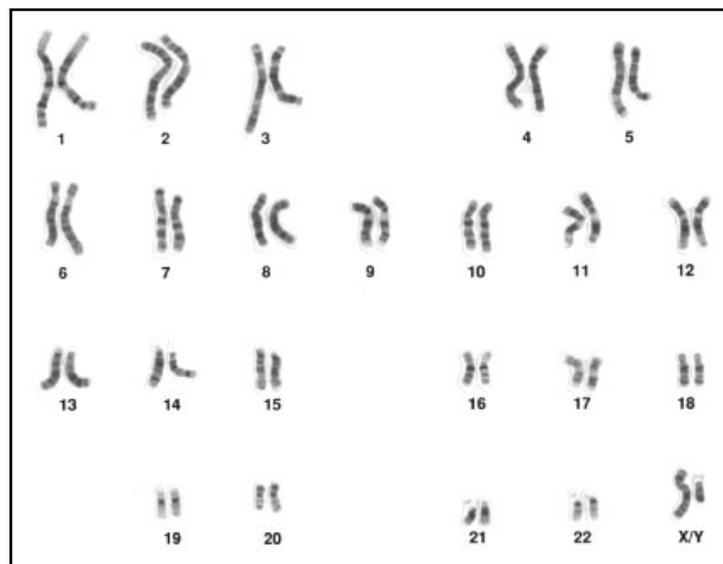


Figura 7: Cariograma humano (46,XY), com bandagem GTG.

Estas técnicas viriam a permitir a detecção de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações de segmentos cromossômicos, no entanto, a citogenética convencional apresenta algumas limitações. A utilização de cromossomas de alta resolução (550-850 bandas) pressupõe que pequenas anomalias estruturais (>3-5 Mb) possam ser detectadas. Contudo, deleções ou duplicações com tamanho inferior a 3-5 Mb não são possíveis de detectar pela citogenética convencional (Hultén *et al.*, 2003; Ogilvie, 2003; Shaffer e Bejjani, 2004). Uma outra limitação é a necessidade de passar por um período de cultura para a obtenção de cromossomas em metafase. Deste modo, para um estudo mais direccionado, ou mesmo em células em interfase, utilizam-se técnicas de citogenética, ou genética molecular, que permitem um diagnóstico parcial, mas mais rápido do que a citogenética convencional, quando efectuada em células em interfase (Pertl *et al.*, 1997; Ogilvie, 2003; Shaffer e Bejjani, 2004; El Mouatassim *et al.*, 2004; Cirigliano *et al.*, 2006). Estes progressos na área da biologia molecular vêm auxiliar no trabalho de diagnóstico, possibilitando que este seja menos laborioso e dispendioso, uma vez que permite a análise de um grande número de amostras em simultâneo (Palomares *et al.*, 2006).

1.7.2- Novas tecnologias complementares de biologia molecular

Na área da biologia molecular têm emergido novas tecnologias que têm permitido a detecção de anomalias cromossômicas específicas que possibilitam diminuir o tempo de espera do resultado citogenético, associado à cultura e análise microscópica. Entre as técnicas de citogenética molecular é de referir a *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH), e de entre as de genética molecular destaca-se a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) (Klinger *et al.*, 1992; Pertl *et al.*, 1997; Schouten *et al.*, 2002; El Mouatassim *et al.*, 2004; Cirigliano *et al.*, 2006). Estas técnicas têm como principal vantagem dispensarem a cultura celular, uma vez que podem utilizar células em interfase (FISH) ou o DNA total (MLPA), e obterem-se assim, resultados ao fim de 24 a 48 horas (Pergament *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2005).

1.7.2.1- *Fluorescent in situ Hybridization*

Joe Gal e Mary Lou Pardue, utilizaram a hibridização *in situ* pela primeira vez em 1969, tendo por base a observação de que sequências de nucleótidos complementares podiam hibridizar entre si e formar complexos mais estáveis do que as sequências não complementares. A observação das primeiras hibridizações *in situ* necessitavam de radioactividade, sendo em 1977 introduzidos os anticorpos marcados com fluorescência que hibridizavam com regiões específicas de DNA-RNA (Rudkin e Stollar, 1977).

Em 1986, Pinkel e Gray utilizaram pela primeira vez a técnica de *Fluorescent in situ Hybridization* em diagnóstico (Fan, 2002). Trata-se de uma técnica de citogenética molecular que veio complementar a citogenética convencional, uma vez que permite a detecção e localização de sequências específicas de DNA, através da utilização de moléculas fluorescentes que são usadas como sondas que hibridizam com regiões específicas dos diferentes cromossomas (Figura 8), (van Ommen *et al.*, 1995; Shaffer e Bejjani, 2004).

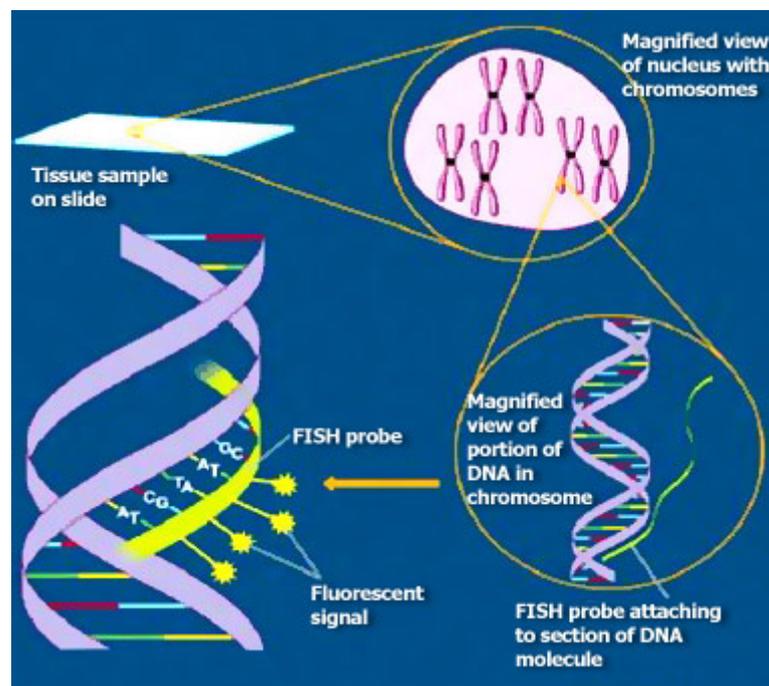


Figura 8: Diagrama das principais etapas da técnica de FISH. Ocorre ligação da sonda de DNA à molécula fluorescente, de modo a que se possa observar ao microscópio. A palavra *in situ* significa que a hibridização ocorre no local, neste caso, no interior do núcleo das células que foram previamente fixadas em lâminas (<http://www.vysis.com>).

Na FISH utilizam-se diferentes tipos de sondas, como por exemplo as de sequência única, as α -satélite, as subteloméricas, as centroméricas e as de pintura cromossómica (Shaffer e Bejjani, 2004; Dudarewicz *et al.*, 2005).

O método de marcação das sondas pode ser directo ou indirecto (Fan, 2002). A marcação directa pressupõe a ligação de um fluorocromo à sonda de DNA, que após a sua ligação à sequência de DNA complementar da amostra, possibilita a visualização do sinal fluorescente (Nicolini *et al.*, 2004; Murthy e Demetrick, 2006). Relativamente, à marcação indirecta, esta é mais laboriosa pois requer a mediação de anticorpos, sendo os mais comuns a biotina-avidina e a digoxigenina (Gardner e Sutherland, 2004).

Os fluorocromos permitem a identificação das sequências complementares pela emissão de sinais fluorescentes visualizados através de um microscópio de fluorescência (Verma e Babu, 1995; Fan, 2002).

Os microscópios apresentam diversos filtros que combinados permitem a observação de múltiplas cores em simultâneo, o que possibilita a identificação de todos os cromossomas humanos, recorrendo à marcação de cada um com fluorocromos diferentes (Thilaganathan *et al.*, 2000).

A FISH pode ser usada na análise de células em metafase, o que permite a detecção de pontos de quebra nos cromossomas, microdelecções e microduplicações que não são possíveis de detectar pela citogenética convencional, ou a identificação de material extra de origem desconhecida. Também pode ser útil na detecção de alguns rearranjos específicos dos cromossomas, em determinados tipos de cancro (Dudarewicz *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2003).

A sensibilidade desta técnica, de detectar duplicações e deleções com tamanho inferior a 5Mb, é maior que a da citogenética clássica, contudo, depende da síndrome em estudo. Em determinadas síndromes, como é o caso da síndrome de *Williams*, a sonda é específica para o gene em estudo, no entanto, em síndromes como as de *Prader-Willi/Angelman*, a etiologia destas é heterogénea e as microduplicações ou microdelecções são apenas algumas das causas da doença (Dudarewicz *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2003).

O diagnóstico de células em interfase, pela FISH, não necessita de cultura de células, o que reduz o tempo necessário para o diagnóstico, no entanto, esta metodologia providência resultados parciais e é laboriosa na análise ao microscópio, pois envolve a contagem de um elevado número de células (metafases e/ou interfases), a fim de eliminar situações de falsos positivos ou falsos negativos, e avaliar possíveis níveis de

mosaicismo, em que a sua detecção depende do número de células analisadas. Face a esta limitação, o número de amostras que podem ser processadas simultaneamente é limitado (Hultén, *et al.*, 2003; Dudarewicz *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2003; Tepperberg *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2004).

Ocasionalmente, na FISH existem situações de resultados inconclusivos, que estão associados a um *background* inespecífico, à ligação não específica das sondas fluorescentes ao citoesqueleto ou ao estado de degradação dos cromossomas (D'Alton *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2002). O tamanho da região alterada de um determinado cromossoma também pode ser um factor limitante na identificação de pontos de quebra (Aldosari *et al.*, 2002). Além disso, esta técnica não consegue detectar rearranjos equilibrados (Dudarewicz *et al.*, 2005). Sendo, no entanto, uma técnica de elevada sensibilidade, especificidade e relativamente rápida, a FISH tornou-se numa poderosa ferramenta de diagnóstico para muitos laboratórios de citogenética (Mundle e Sokolova, 2004).

1.7.2.2- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Recentemente têm surgido tecnologias na área da biologia molecular que têm vindo a responder às necessidades exigidas pelos novos avanços, como o desenvolvimento de novos *hardwares*, *softwares*, sondas, reagentes, assim como a necessidade de analisar um maior número de casos, num menor espaço de tempo. Um exemplo é o caso da técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) que foi descrita pela primeira vez em 2002 por Schouten e colaboradores. (Mann *et al.*, 2004; Slater *et al.*, 2003). Esta técnica permite a quantificação relativa de cerca de 40 sequências de DNA diferentes, numa só reacção que utiliza cerca de 100-150 ng de DNA da amostra, identificando-se, rapidamente, amplificações e deleções de um grande número de genes (Schouten *et al.*, 2002). Esta metodologia pode ser usada tanto na quantificação de DNA ou RNA proveniente de sangue, como de amostras derivadas de tumores. Pode ainda ser utilizada para quantificar metilações CpG (*Methylation-Specific MLPA*), (<http://www.mlpa.com>).

Esta metodologia consiste na utilização de diferentes sondas, que são amplificadas através de um PCR, usando *primers* únicos que se ligam às sondas (Figura 9), (Rooms *et al.*, 2004; Langerak *et al.*, 2005). Para cada sequência genómica existe uma sonda que

é constituída por dois oligonucleótidos, (um sintético e outro derivado do fago M13), que hibridizam em locais adjacentes à sequência alvo e posteriormente são ligados (Slater *et al.*, 2003). O oligonucleótido curto (sintético), consiste numa sequência específica ligada ao DNA alvo na extremidade 3' e uma sequência universal de ligação do *primer forward* ou *reverse* na extremidade 5'. O oligonucleótido longo é derivado do fago M13, e é constituído por uma sequência específica de ligação ao DNA alvo que é clonada num vector SALSA derivado do fago M13 na extremidade 5', e uma sequência na extremidade 3' que contém o *primer* não marcado que é comum em todas as sondas, e entre estas, uma sequência de tamanho variável (Schouten *et al.*, 2002).

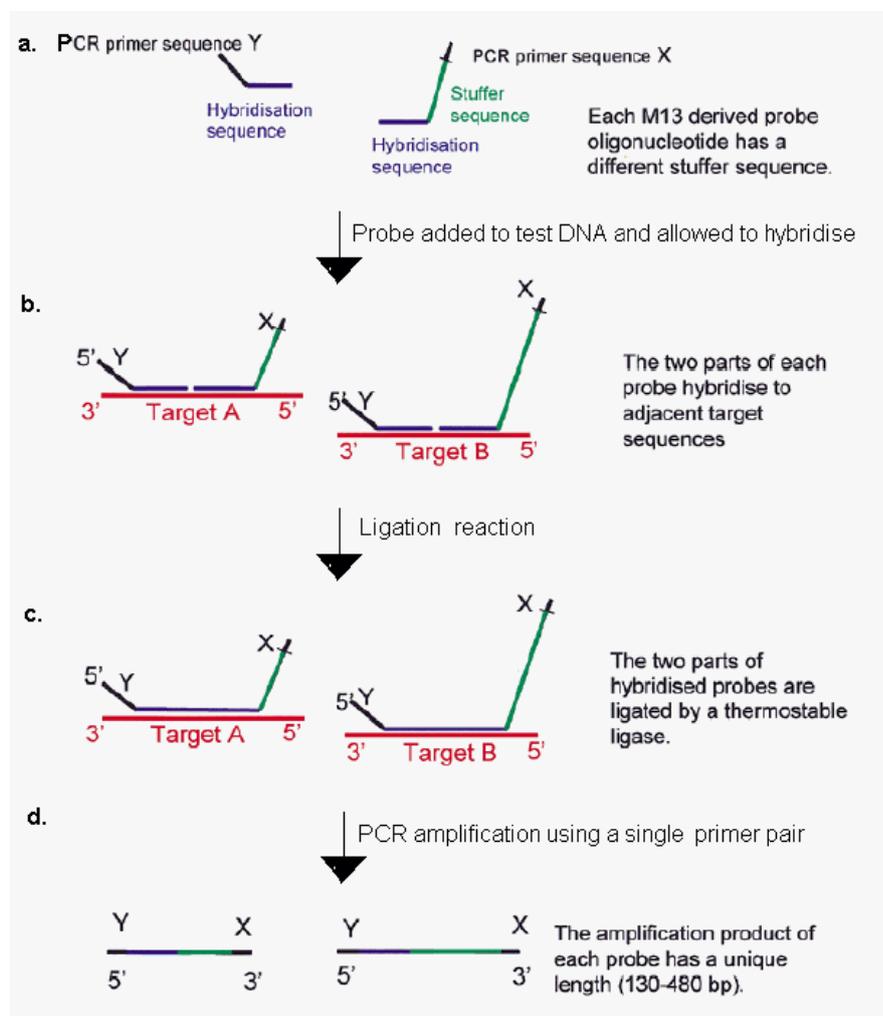


Figura 9: Descrição dos passos envolvidos na técnica de MLPA. Esta tecnologia é baseada na identificação das sequências alvo pela hibridização das sondas de MLPA, que se ligam às sequências adjacentes, unindo-se através de uma reacção de ligação. As sequências são amplificadas por uma reacção de PCR, usando um único par de *primers* (Adaptado de Schouten *et al.*, 2002).

A hibridização ocorre num período variável de 12 a 20 horas, seguindo-se a ligação entre cada par de sondas adjacentes, pela acção de uma ligase, formando-se depois, uma sequência alvo que será amplificada (Schouten *et al.*, 2002). Todas as sondas têm sequências terminais idênticas, permitindo a amplificação por PCR, usando um único par de *primers* marcados com um fluorocromo (Figura 9), (Slater *et al.*, 2003).

Os produtos amplificados são separados por electroforese capilar e cada sonda dá origem a um produto de amplificação de tamanho variável, o que reflecte o número relativo de cópias das sequências alvo e as que estão localizadas nas extremidades dos cromossomas delectados ou duplicados podendo assim, ser facilmente identificadas (Schouten *et al.*, 2002; Rooms *et al.*, 2004). A quantificação das áreas referentes a cada um dos cromossomas é calculada através dos dados exportados do *software* de análise do sequenciador (GeneScan da Applied Biosystems) para uma folha de Excel (Figura 10), ou recorrendo ao programa específico de análise para MLPA, Coffalyser (MRC-Holland), (Schouten *et al.*, 2002; <http://www.mlpa.com>).

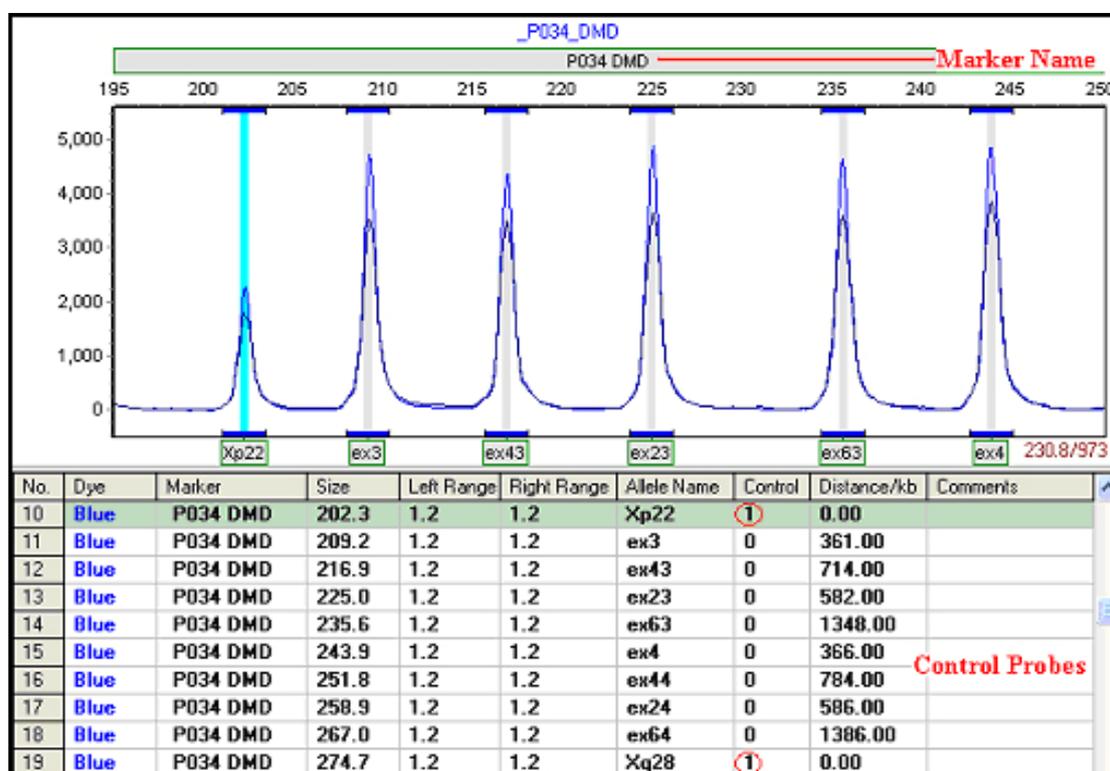


Figura 10: Exemplo dos resultados obtidos pela técnica de MLPA (<http://www.softgenetics.com>).

Este método permite diagnosticar:

- As aneuploidias mais comuns em diagnóstico pré-natal;
- Diagnosticar síndromes de microdeleções cromossômicas como por exemplo *DiGeorge*, *Prader-Willi*, *Angelman*, *Williams*;
- Detecção de deleções subteloméricas;
- Duplicações e deleções de exões ou de genes responsáveis por várias doenças genéticas (ex. distrofia muscular de *Duchenne*, atrofia muscular espinal, neurofibromatose tipo II);
- Faculta a detecção de deleções de genes associados à metilação (Síndromes de *Prader-Willi* e *Angelman*);
- mRNA de genes envolvidos na apoptose e na inflamação;
- Deleções/amplificações cromossômicas em tumores (<http://www.mlpa.com>).

Esta técnica tem uma elevada sensibilidade e especificidade, discriminando sequências que diferem apenas num único nucleótido, sendo uma alternativa eficaz quando é necessário obter um resultado rápido (Gerdes *et al.*, 2004).

A MLPA apresenta, ainda outras vantagens relativamente à citogenética convencional, no que diz respeito aos baixos custos e à capacidade de análise de um elevado número de amostras em simultâneo (Hochstenbach *et al.*, 2005). Contudo, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, o resultado ser dependente da qualidade da amostra, a não detecção de outras aneuploidias autossômicas (para as quais não foram usadas sondas), mosaicos de baixa expressão, triploidia (ex: 69,XXX), contaminação materna e rearranjos estruturais equilibrados (translocações, inversões, inserções). Deste modo, esta metodologia deve ser usada conjuntamente com a citogenética convencional e outras técnicas moleculares, como por exemplo a *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR), o *Array Comparative Genomic Hybridization* (Array-CGH), entre outras (Slater *et al.*, 2003; Hochstenbach *et al.*, 2005).

1.7.2.3 – *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

Algumas variantes da técnica de MLPA têm sido desenvolvidas ao longo destes anos, como é o caso da *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA), que é um método relativamente simples e pouco dispendioso que detecta alterações no estado de metilação, assim como alterações no número de cópias, numa simples reacção. As sondas de MLPA para a quantificação da metilação são semelhantes às sondas usadas na reacção de MLPA normal, no entanto, a sequência detectada pelas sondas da MS-MLPA contém sequências que são reconhecidas por uma enzima de restrição sensível à metilação (Nygren *et al.*, 2005; Bittel *et al.*, 2007; <http://www.mlpa.com>).

A MS-MLPA é agora amplamente usada para a detecção de alterações epigenéticas. Uma das suas principais aplicações é a detecção de padrões de metilação em doenças que envolvem genes de *imprinting* genético, como é o caso das síndromes de PWS/AS, e de *Beckwith Wiedemann* (Bittel *et al.*, 2007; Procter *et al.*, 2006). Esta técnica é também frequentemente usada na análise tumoral (<http://www.mlpa.com>).

Tal como no método *standard* de MLPA, o protocolo para a MS-MLPA começa com a desnaturação da amostra de DNA e a hibridização *overnight*. De seguida, a reacção é dividida em dois tubos. Um tubo é processado como na reacção *standard* de MLPA, possibilitando a detecção do número de cópias, enquanto o outro tubo é incubado com a endonuclease HhaI sensível à metilação, ao mesmo tempo que as sondas hibridizadas se ligam. Deste modo, apenas as amostras de DNA não metiladas são digeridas pela enzima HhaI. As sondas digeridas não vão ser amplificadas por PCR, e assim, não geram um sinal quando analisadas por electroforese de capilaridade. Em contraste, se a amostra de DNA estiver metilada, ou seja, não foi digerida pela HhaI, vai originar um sinal (Figura 11), (<http://www.mlpa.com>).

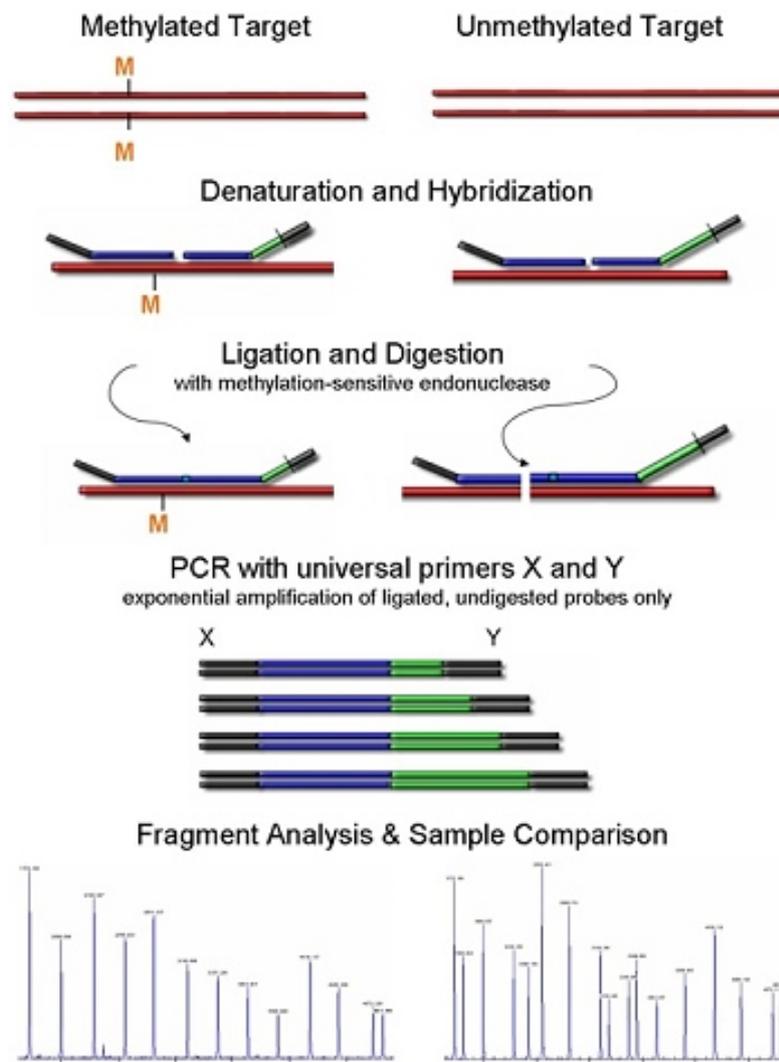


Figura 11: Descrição dos passos envolvidos na técnica de MS-MLPA. Protocolo semelhante à reacção *standart* de MLPA, em que a principal diferença é o uso de uma enzima de restrição sensível à metilação. Depois da digestão com esta enzima, apenas as amostras não digeridas, ou seja, metiladas são amplificadas por PCR, detectando-se um sinal por electroforese capilar que se traduz num pico de tamanho variável (<http://www.mlpa.com>).

2 - Objetivos

2 - Objectivos

O objectivo principal deste estudo é relacionar o espectro do autismo com alterações cromossómicas na região 15q11.2, do cromossoma 15, através de técnicas de citogenética molecular, nomeadamente a FISH e de técnicas de genética molecular, como a MLPA, e assim avaliar a sua frequência na etiologia do autismo.

Com este estudo citogenético pretende-se ainda, comparar as duas técnicas de diagnóstico, em termos de especificidade, sensibilidade e robustez, e ainda, numa fase posterior, realizar estudos familiares para identificar a origem das alterações observadas e consequentemente as famílias de risco.

3 - Materiais e Métodos

3- Materiais e Métodos

3.1- Amostra

Entre Janeiro de 2000 e Junho de 2009 foram recebidas, no Laboratório de Citogenética do Instituto de Biologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra 556 amostras de sangue periférico de pacientes referenciados com quadros específicos de autismo, provenientes da consulta de Autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra.

Todos os 556 casos foram analisados por citogenética convencional (550-700 bandas) e desses, em 429 foi feito o estudo molecular pela FISH, para uma análise mais direccionada da região 15q11.2. Como a FISH apresenta algumas limitações, pretendeu-se implementar a técnica de MS-MLPA para o estudo da etiologia do autismo. Assim, entre Novembro de 2008 e Junho de 2009, foram analisadas as primeiras 134 amostras por MS-MLPA, para além do estudo citogenético e de FISH. Após a validação desta técnica, 100 casos consecutivos sem discrepância entre os resultados obtidos por MS-MLPA e FISH, os casos foram estudados, por citogenética convencional e MS-MLPA, sendo a FISH usada, apenas, para confirmação de possíveis alterações encontradas.

3.2- Citogenética Convencional

Para a obtenção do cariótipo é necessário estabelecerem-se culturas sincronizadas a partir de linfócitos de sangue periférico, pelos procedimentos de rotina do laboratório. Resumidamente, o sangue é recolhido num tubo de heparina de sódio e a sementeira deverá ser realizada até oito dias, após a sua chegada, sendo os tubos guardados no frigorífico até à sua sementeira.

Depois de estabelecida a cultura, há um período de incubação, seguido de uma manipulação para obtenção de cromossomas, e espalhamento destes numa lâmina histológica, em condições específicas de humidade e temperatura.

A análise citogenética foi efectuada a partir de metafases com bandas GTG com um nível de resolução de 500 a 700 bandas (ISCN, Shaffer e Tommerup, 2005). Em cada paciente foram examinadas 10 a 15 metafases.

3.3- *Fluorescent in situ Hybridization*

Como o autismo está associado a alterações cromossômicas em determinadas regiões, nomeadamente, a região 15q11-q13, utilizaram-se sondas especiais para este tipo de estudo, tais como a UBE3A e a SNRPN que hibridizam especificamente com a região 15q11.2. Estas duas sondas são de sequência única e têm uma região crítica que está ligada a um fluoroforo vermelho, e uma região controlo localizada em 15q24 que está ligada a um fluoroforo verde, servindo como controlo da hibridização (Figura 12). No presente estudo foram utilizadas estas duas sondas que estão disponíveis comercialmente através da *Cytocell (Aquarius)*. Segue-se a descrição das etapas essenciais da sua metodologia experimental.

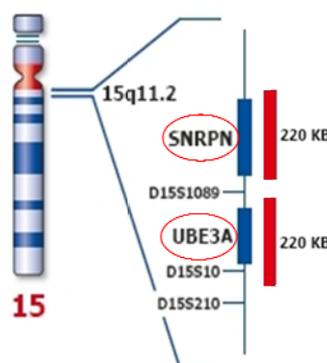


Figura 12: Representação esquemática da localização das sondas utilizadas para o estudo por FISH, da região 15q11.2, associada ao autismo (Adaptado de <http://www.kreatech.com>).

Para a realização da técnica de FISH utilizam-se as células obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, pelos procedimentos de rotina do laboratório. As amostras podem ser guardadas a 4°C ou a -20°C. Após a sua centrifugação a 1200 rpm, durante 8 minutos, ressuspende-se o *pellet* em cerca de 4 ml de fixador 1:3 (ácido acético : metanol). De seguida, espalham-se as células em lâminas histológicas, (aplicando 8-10 µl da suspensão celular com uma micropipeta) segundo condições específicas de temperatura e humidade, de modo a se obter um número de metafases com cromossomas individualizados, para permitir a sua análise. É necessária

uma avaliação destas lâminas num microscópio de contraste de fase, para avaliar a qualidade das metafases em cada área, assim como o índice mitótico e a densidade celular. As lâminas são depois submetidas a um envelhecimento à temperatura ambiente, de pelo menos 24h.

Após o espalhamento, as lâminas passam por um pré-tratamento com o objectivo de tornar o DNA mais acessível à hibridização, e de proteger a integridade dos cromossomas. Deste modo, as lâminas são incubadas numa solução salina SSC 2X (Anexo A-1 e 2), durante 2 minutos, a 37°C. Retiram-se as lâminas e desidratam-se as células em soluções sucessivas de etanol a 70%, 85% e absoluto (Anexo A - 3 e 4), durante 2 minutos em cada solução.

As cadeias duplas de DNA da sonda e do paciente em estudo (DNA alvo) têm que ser convertidas em cadeia simples com o auxílio de temperaturas elevadas, sendo combinados de modo a permitir a hibridização das sequências de DNA complementares (Thein *et al.*, 2000; Speicher e Carter, 2005). Para tal, aplica-se 1.5 µl de cada sonda a cada uma das áreas, sendo cada uma delas coberta com uma lamela de plástico. Desnaturam-se as lâminas numa placa quente, a 76°C, durante 8 minutos (este tempo é variável consoante o envelhecimento das células). De seguida, colocam-se as lâminas numa câmara húmida, *overnight*, por um período mínimo de 16 horas, numa estufa a 37°C, de modo a permitir a hibridização da sonda à sequência alvo.

No dia seguinte, é necessário realizarem-se as lavagens pós-hibridização. Esta etapa permite retirar o excesso de sonda, eliminando hibridizações inespecíficas. Cada tipo de sonda tem uma temperatura e tempo de lavagem adequados. Assim, colocam-se as lâminas numa solução de SSC 2X com *Tween 20* (Anexo A-5), à temperatura ambiente, para remover as lamelas. De seguida, incubam-se as lâminas numa solução de SSC 2X (Anexo A-1 e 2), previamente aquecida a 70°C, durante 30 segundos, e transferem-se as lâminas para a solução de SSC 2X com *Tween 20* (Anexo A-5), à temperatura ambiente, durante 1 minuto. Aplicam-se 4 µl da solução de contraste *DAPI* (*Vectashield mounting medium with DAPI, Vector*) sobre cada área de hibridização, e coloca-se uma lamela de vidro sobre as lâminas, com cuidado, para evitar a formação de bolhas de ar. Por fim, colocam-se as lâminas numa caixa escura, no frigorífico, por um período mínimo de 10 minutos até ao início da observação microscópica.

3.3.1- Análise microscópica

Para observar as lâminas ao microscópio de epifluorescência (Nikon), é necessário o uso sequencial dos filtros *DAPI*, *FICT* e *Texas Red*. Um sinal normal em cada área, traduz-se em dois sinais verdes na região 15q24, e em dois sinais vermelhos na região 15q11.2. Cada metafase é cuidadosamente analisada, de modo a confirmar-se o número de sinais para cada sonda, a localização e a intensidade dos sinais. Para cada caso são analisadas 20 metafases e 5 interfases em cada área. No caso de surgirem discordâncias entre as células avaliadas, terão que ser estudadas um maior número de células.

3.4- Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

A análise por MS-MLPA foi efectuada a partir do DNA isolado de linfócitos de sangue periférico, recolhidos em EDTA. A extracção de DNA foi realizada com o *kit* comercial *JETQUICK Blood Midi/Maxi Spin* (Genomed). Para a técnica de MS-MLPA foi utilizado o *Kit MLPA SALSA ME028 Prader-Willi/Angelman*, comercializado pela MRC-Holland.

3.4.1- Extracção de DNA pelo Kit JETQUICK Blood Midi/Maxi Spin

A extracção de DNA efectuou-se a partir de linfócitos de sangue periférico recolhido em EDTA, seguindo a metodologia descrita na bula do *kit* comercial *JETQUICK Blood Midi/Maxi Spin* (Genomed), (Anexo B). Esta extracção é o passo inicial no processo de MS-MLPA, e tem como objectivo separar o DNA das diferentes estruturas extra e intracelulares que o rodeiam.

Independentemente do procedimento a seguir, a extracção de DNA realiza-se, inicialmente, pela promoção da lise celular e dos seus organelos, e pela criação de condições que permitam estabilizar e armazenar o DNA para utilizações posteriores.

3.4.2- Reacção de MS-MLPA

As amostras foram processadas com o *Kit MLPA SALSA ME028 Prader-Willi/Angelman* (MRC-Holland, Amesterdam, The Netherlands) que possui 32 sondas

específicas para sequências localizadas perto ou na região crítica para as síndromes de PWS e AS no cromossoma 15q11-q13 que podem ser utilizadas para detectar alterações no número de cópias nesta região. Destas sondas, cinco são específicas para uma sequência de *imprinting* e contêm sítios que são reconhecidos pela enzima HhaI sensível à metilação. Para o controlo dos resultados, existem catorze sondas localizadas fora da região crítica para as síndromes de PWS e AS. Este *kit* possui ainda três sondas que indicam a digestão completa pela HhaI na reacção de metilação (Tabela II).

Tabela II: SALSA MLPA ME028 *Prader-Willi/Angelman Probemix* (disponível em www.mlpa.com). Este kit possui 32 sondas específicas para sequências localizadas perto ou na região crítica para PWS e AS. Destas, cinco contêm sítios que são reconhecidos pela enzima HhaI (caixas a vermelho), catorze estão localizadas fora da região crítica e servem como controlo (caixas a verde), e três indicam a digestão completa pela HhaI (caixas a azul).

Length (nt)	SALSA MLPA probe	location	HhaI site	% methylated in blood control DNA
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 03896-L00020	11q13		
136	Reference probe 09824-L10234	10q26		
142	SNRPN probe 04103-L02951	SNRPN CpG island intron 1	+	50% (imprinted)
148	Reference probe 08372-L08226	17q12		
154 x	TUBGCP5 probe 02018-L00865	BP1-BP2 region		
160	UBE3A probe 04620-L00863	UBE3A exon 7		
166	Reference probe 08020-L07801	11q24		
173	MKRN3 probe 02020-L12922			
178	SNRPN probe 04106-L13905	SNRPN CpG island exon 1	+	50% (imprinted)
184 #	UBE3A probe 04641-L04293	UBE3A exon 1	+	0%
190	SNRPN probe 04104-L04294	SNRPN CpG island intron 1	+	50% (imprinted)
196	UBE3A probe 10880-L11550	UBE3A exon 6		
202	APBA2 probe 01314-L00867			
208	Reference probe 07404-L07051	12q13		
214	SNRPN probe 12719-L13907	HBII-85 snoRNA cluster		
220	GABRB3 probe 01315-L09339			
226	ATP10A probe 11159-L11843			
232	Reference probe 08335-L08267	17q21		
238 Y	SNRPN probe 12178-L13090	SNRPN exon u1B*		
244	Reference probe 08051-L07832	5p15		
250	SNRPN probe 11181-L11865	SNRPN CpG island promotor	+	50% (imprinted)
257	SNRPN probe 02027-L12881	SNRPN exon U5		
262	Reference probe 09533-L09943	7q21		
271	SNRPN probe 12182-L13094	SNRPN intron u2		
277	SNRPN probe 12179-L13383	SNRPN intron u2		
286 Y	SNRPN probe 11178-L11862	SNRPN exon u1B		
295	SNRPN probe 01318-L13088	SNURF-SNRPN exon 3		
301	UBE3A probe 12082-L13474	UBE3A exon 8		
310	Reference probe 01576-L01148	22q12		
319	Reference probe 08018-L07799	11q24		
328	SNRPN probe 12723-L13798	HBII-85 snoRNA cluster	+	100%
337 †	Reference probe 01590-L01162	13q14		
348 #	Digestion control 01709-L12924	15q26	+	0% (digestion control)
356	UBE3A probe 02034-L12925	UBE3A exon 13		
364	ATP10A probe 11162-L11846			
373	UBE3A probe 10878-L11548	UBE3A exon 5		
382	GABRB3 probe 10874-L11544			
391	SNRPN probe 12477-L13519	SNRPN exon U5		
400	SNRPN probe 11177-L11861	SNURF-SNRPN exon 7		
409	MAGEL2 probe 11155-L11839			
418 †	NDN probe 04027-L13937		+	30-50% (imprinted)†
427	Reference probe 05330-L04717	1p21		
433 x	NIPA1 probe 06249-L05755	BP1-BP2 region		
445	NDN probe 11149-L11833			
454	Reference probe 08947-L09042	11p15		
463 #	Digestion control 02260-L01747	3p22	+	0% (digestion control)
470	SNRPN probe 12721-L13796	HBII-85 snoRNA cluster		
477	Reference probe 08586-L13082	17q23		

5 µl de DNA são desnaturados no termociclador a 98°C, durante 10 minutos. Posteriormente, adicionam-se 1.5 µl de *SALSA Probe-mix* que foi preparada à temperatura ambiente, com 1.5 µl de *MLPA buffer*. Adicionam-se 3 µl desta mistura a cada tubo de PCR. Estes são novamente incubados, a 95°C, durante um minuto, seguindo-se uma incubação *overnight*, pelo menos, durante 16 horas.

A reacção de ligação e de digestão é o passo seguinte, em que à temperatura ambiente, se prepara a mistura pré-ligação/digestão, juntando 3 µl de *Ligase-buffer A* e 10 µl de água. Em gelo, preparam-se as misturas *Ligase-65* e *Ligase-Digestion*. Para a primeira, adicionam-se 1.5 µl de *Ligase-65 buffer B*, 8.25 µl de água e 0.25 µl da enzima *Ligase-65*. Para a segunda, juntam-se 1.5 µl de *Ligase-65 buffer B*, 7.75 µl de água, 0.25 µl da enzima *Ligase-65* e 0.5 µl da enzima *HhaI* (Promega R6441, 10 units/2 l). A temperatura do termociclador é reduzida para 25°C e adicionam-se a cada amostra 13 µl da mistura pré-ligação/digestão. Deste tubo, transferem-se 10 µl para um novo tubo de PCR, previamente identificado. Incubam-se ambos os tubos a 49°C, pelo menos, durante 1 minuto. Enquanto o termociclador estiver a esta temperatura, adicionam-se 10 µl da mistura *Ligase-65* aos primeiros tubos (análise do número de cópias), e 10 µl da mistura *Ligase-Digestion* aos segundos tubos (análise da metilação). Por fim, procede-se à incubação durante 30 minutos, a 49°C e 5 minutos a 98°C para inactivar a ligase.

Para preparar a reacção de PCR, é necessário identificar novos tubos de PCR para cada amostra, para os quais se transferem 15 µl da *PCR mix* (2 µl de *SALSA PCR buffer* e 13 µl de água) e se adicionam 5 µl do produto de ligação ou 5 µl do produto de digestão. Enquanto os tubos estiverem no gelo adicionam-se 5 µl da *Polimerase mix*, e colocam-se no termociclador, pré-aquecido a 72°C. Inicia-se, de imediato, a reacção de PCR, de 37 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C. No final dos 37 ciclos, as amostras são incubadas durante 20 minutos a 72°C.

A reacção de PCR realizou-se com um único par de *primers*. Um *primer* marcado com o fluorocromo *6-carboxy fluorescein* (FAM), cuja sequência é 5'-G-FAM-GGGTTCCTAAGGGTTGGA-3'. A sequência do *primer* não marcado é 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'.

A electroforese capilar inicia-se com a preparação da solução de desnaturação, adicionando 0.3 µl do marcador interno de tamanho ROX-500 (500 ROXTM Size Std Gene ScanTM, ABI) e 9.1 µl de formamida desionizada (HI-DITM Formamide, ABI). De seguida, adicionam-se 9.4 µl desta mistura a 1 µl do produto de PCR de cada amostra e

desnatura-se durante 5 minutos, a 95°C. As amostras são colocadas no sequenciador automático ABI PRISM 310 (ABI, Foster City, USA).

A análise dos resultados, tanto a nível do número de cópias, como da metilação é efectuada pela transferência de dados obtidos com o *software* GeneScan (GeneScan Software V3.2.1; Applied Biosystem) para o programa específico de análise para MLPA, o Coffalyser (MRC-Holland).

Os resultados obtidos a partir das amostras digeridas e não digeridas devem ser, primeiramente, normalizadas intra-amostra, pela comparação do sinal de cada sonda contra todas as sondas referência separadamente, e assim, criam-se tantos *ratios* por sonda, como o número de sondas de referência existentes. A média de todos os *ratios* produzidos por sonda dá uma estimativa do *ratio* final das sondas. Esta média pode ser usada tanto na análise do número de cópias, como na análise da metilação. Os *ratios* das amostras em estudo são comparados com os *ratios* obtidos de amostras de indivíduos normais para a região em estudo, verificados por FISH. Assim, as possíveis variações detectadas nos resultados das amostras dos pacientes, em relação às amostras controlo, representam alterações cromossómicas. O cálculo da razão das áreas deve ser próximo de 1. As amostras com a região em estudo duplicada devem apresentar um aumento na área relativa $\geq 1,3$ e as amostras com deleção devem apresentar valores $\leq 0,7$.

4- Resultados

4- Resultados

A etiologia do autismo é ainda desconhecida, não se sabendo quais os genes associados, todavia, parecem existir determinadas regiões cromossômicas mais susceptíveis, como por exemplo a 15q11-q13 que está localizada no braço longo do cromossoma 15 (Andres, 2002).

Todos os 556 casos analisados entre Janeiro de 2000 e Junho de 2009, no laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foram referenciados com quadros específicos de autismo. Para todos estes casos foi feito o estudo do seu cariótipo, por citogenética clássica, recorrendo-se às técnicas de FISH e MLPA como complementos deste, afim de se poder caracterizar a região crítica de uma maneira mais detalhada.

A análise por FISH foi feita com as sondas para os *loci* UBE3A e SNRPN que estão localizadas na região 15q11.2 (região crítica para as síndromes de PWS e AS), (Figura 13), tendo-se observado no mínimo 20 células metafásicas e cinco interfásicas para cada sonda.

A técnica de MLPA permite um estudo mais detalhado da região 15q11-q13, uma vez que o *kit* utilizado neste estudo, a SALSA ME028, além de conter alguns genes localizados na região crítica para as síndromes de PWS e AS, como o MKRN3, o MAGEL2, o NDN, o SNRPN, o UBE3A, o ATP10A e o GABRB3, contém ainda, genes como o TUBGCP5, o NIPA1 que estão localizados entre os pontos de quebra BP1 e BP2, e o gene APBA2 que está localizado fora desta região (Figura 13).

Dos 556 casos autistas que foram referenciados ao laboratório, 429 foram estudados pela técnica de FISH. Desses casos, 134 foram ainda analisados pela técnica de MLPA, sendo encontradas anomalias cromossômicas em sete pacientes (~1,6%), que estão descritas na Tabela III, juntamente com o quadro clínico destes pacientes. Dessas sete anomalias, em dois probandos foram encontradas duplicações intersticiais da região 15q11-q13 (28,6%), noutros dois pacientes observaram-se triplicações intersticiais desta mesma região, (28,6%) e nos restantes, um apresentava um cromossoma supranumerário derivado do cromossoma 15 (14,3%), outro revelou um marcador também supranumerário do cromossoma 15, mas em mosaico (14,3%), e o outro uma microduplicação entre os pontos de quebra BP1 e BP2 (14,3%), (Figura 14, Tabela III). Apenas duas destas alterações apresentaram resultados discordantes entre a FISH e a MLPA. A primeira análise de FISH feita ao paciente 2 revelou uma duplicação, mas

quando se realizou o estudo por MS-MLPA, este mostrou tratar-se de uma triplicação. O outro caso que apresentou resultados diferentes, tratou-se do paciente 7, em que a MS-MLPA detectou uma microduplicação entre os pontos de quebra BP1 e BP2. Esta alteração não foi detectada pela FISH, uma vez que as sondas utilizadas nesta técnica, apenas hibridizam para os *loci* UBE3A e SNRPN, não sendo utilizadas sondas específicas para os *loci* localizados entre os pontos de quebra BP1 e BP2.

A média das idades dos indivíduos com autismo foi de 7,05 anos, variando entre os 22 meses e os 21 anos. Verificou-se uma predominância sexual de aproximadamente 5,8:1 entre homens e mulheres, respectivamente (474:80).

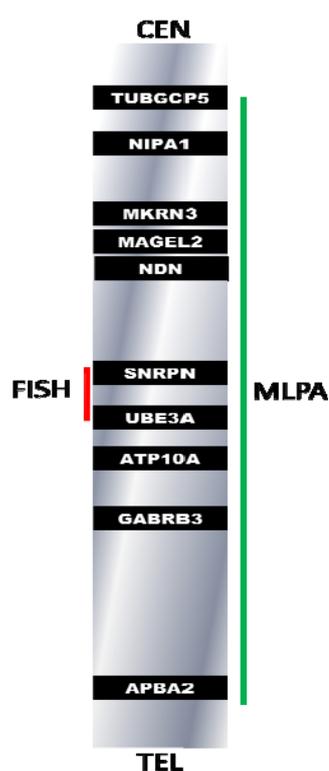


Figura 13: Representação esquemática da região 15q11-q13, com a localização das sondas usadas na FISH e das sondas usadas na MS-MLPA. Os genes MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e o GABRB3 estão localizados na região crítica para as síndromes de PWS e AS. Os genes TUBGCP5 e NIPA1 estão localizados entre os pontos de quebra BP1 e BP2. E o gene APBA2 que está localizado fora da região crítica para as síndromes de PWS e AS.

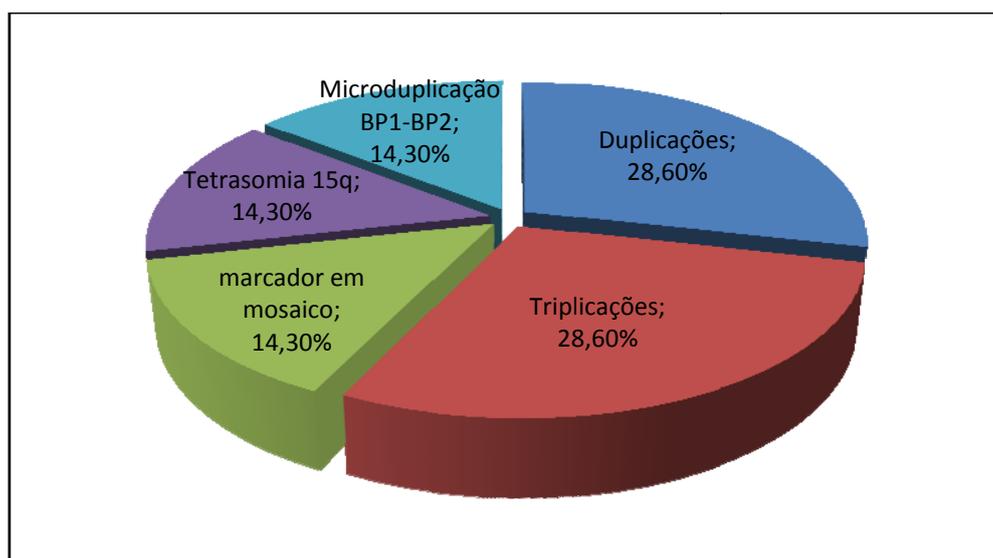


Figura 14: Distribuição das anomalias cromossômicas encontradas em 1,6% (7/429) dos pacientes.

Tabela III: Resumo das anomalias cromossômicas encontradas e correspondente quadro clínico dos pacientes. GTG: análise citogenética por bandagem G; FISH: *Fluorescent in situ Hybridization*; MS-MLPA: *Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Paciente	Anomalia cromossômica	Técnica de Diagnóstico	Quadro Clínico
1	Derivativo do 15 (Tetrasomia 15q11.2)	GTG/FISH	Autismo grave, deficiência mental grave, sem dismorfismos, problemas coordenação motora (caminhou aos 3 anos) , não verbal.
2	Triplicação 15q11.2	GTG/FISH/MS-MLPA	Autismo ligeiro a moderado, deficiência mental ligeira a moderada, problemas coordenação motora (caminhou aos 24 meses) , verbal, crescimento P25, estatura P25, perímetro craniano P50, sem dismorfismos.
3	Mosaico + marcador do 15	GTG/FISH/MS-MLPA	Autismo atípico, deficiência mental ligeira, caminhou aos 16 meses , verbal com um atraso ligeiro, crescimento P75, estatura P>2<50, perímetro craniano P>media< + 2dp, <i>minor face</i> .

4	Duplicação 15q11.2	GTG/FISH/ MS-MLPA	Autismo severo, deficiência mental severa, caminhou aos 12 meses , não verbal, sem dismorfismos.
5	Triplicação 15q11.2	GTG/FISH/ MS-MLPA	Autismo moderado, deficiência mental severa, problemas de coordenação motora (caminhou aos 24 meses) , atraso grave na linguagem, crescimento P90, estatura P75, perímetro craniano médio, sem dismorfismos, epilepsia.
6	Duplicação 15q11.2	GTG/FISH/ MS-MLPA	Autismo severo, deficiência mental moderada, caminhou aos 18 meses , atraso moderado na linguagem, crescimento P90, estatura P75, perímetro craniano médio, sem dismorfismos
7	Microduplicação BP1- BP2	GTG/FISH/ MS-MLPA	Autismo ligeiro, sem deficiência mental, caminhou aos 12 meses , verbal, crescimento P75, estatura P75, perímetro craniano P75, sem dismorfismos

Segue-se uma descrição mais detalhada dos casos onde foram encontradas as anomalias cromossômicas.

Caso 1

O caso identificado com o número 1, referente a uma menina autista de 4 anos, foi estudado por citogenética convencional e molecular. O resultado obtido pela citogenética clássica mostrou um cromossoma marcador supranumerário (Figura 15). Recorrendo à técnica de FISH foi possível identificar a sua origem no cromossoma 15, utilizando uma sonda centromérica, a D15Z4, o que mostrou tratar-se de um cromossoma isodicêntrico com 2 centrómeros (D15Z4⁺⁺), (Figura 16 a). Quando se aplicaram as sondas para os *loci* SNRPN e UBE3A verificou-se que estes se encontravam duplicados (Figura 16 b e c). Portanto, esta paciente é portadora de uma tetrasomia da região proximal do cromossoma 15 (pter~> q11.2), apresentando um cariótipo 47,XX,+mar.ish idic(15)(q11.2)(D15Z4⁺⁺,SNRPN⁺⁺,UBE3A⁺⁺)mat. Como não houve acesso a material biológico colhido em EDTA para extração de DNA, não foi possível prosseguir para estudos de MLPA.

Perante este resultado de citogenética foi seguido o protocolo em que se realizou o estudo citogenético, cariótipo e FISH, nos progenitores, o que revelou que a mãe também apresentava o derivativo do 15 isodicêntrico e com os *loci* SNRPN e UBE3A duplicados, tal como a paciente 1 [47,XX,+mar.ish idic(15)(q11.2) (D15Z4++,SNRPN++,UBE3A++)], (Figuras 17 e 18).

Face a estes resultados, e dado que a mãe desta criança apresenta um ligeiro atraso mental, é provável que a duplicação seja a causa do autismo na criança.

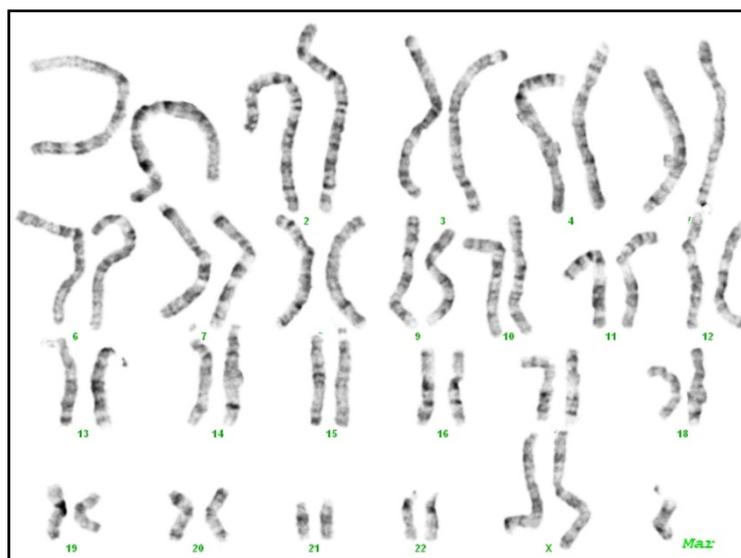
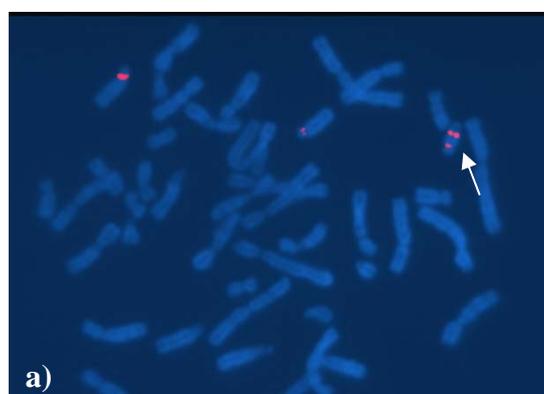


Figura 15: Cariótipo, com bandas GTG do caso 1, mostrando um cromossoma supranumerário (marcador) de origem desconhecida.



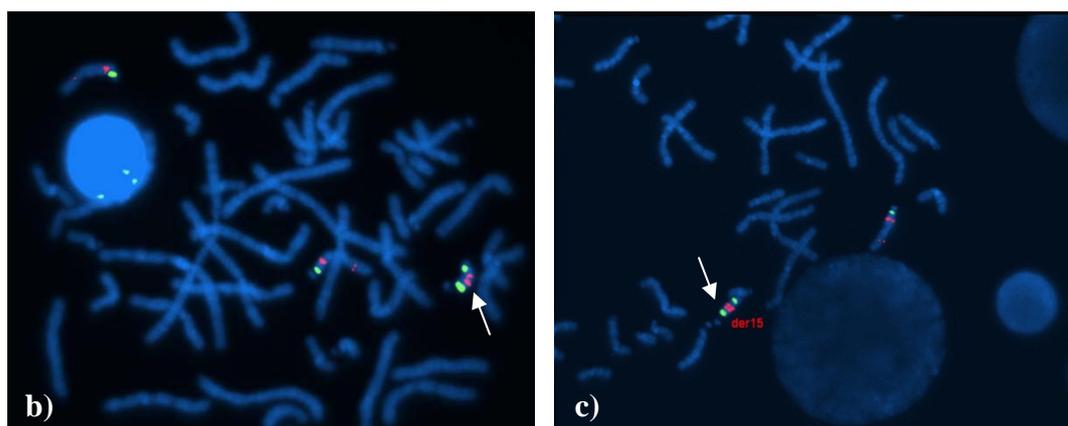


Figura 16: Caso 1: FISH em metafase, em que o cromossoma marcador mostrou ter origem no cromossoma 15, uma vez que apresentou sinais de hibridização com 3 sondas específicas. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma derivativo. Hibridização com **a)** sonda centromérica D15Z4 (vermelho) **b)** sonda de sequência única UBE3A (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde) e **c)** sonda de sequência única SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde), para a região 15q11.2, do paciente 1.

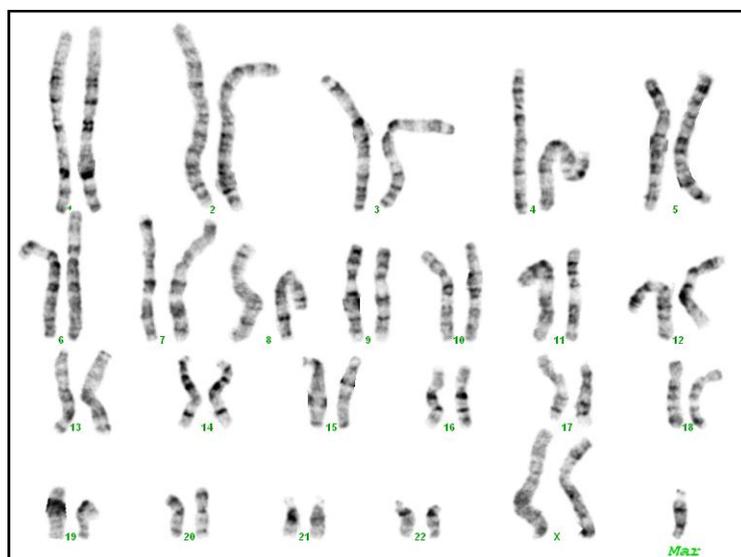


Figura 17: Cariótipo, com bandas GTG da mãe do paciente 1, mostrando um cromossoma supranumerário semelhante ao observado na filha (Figura 15).

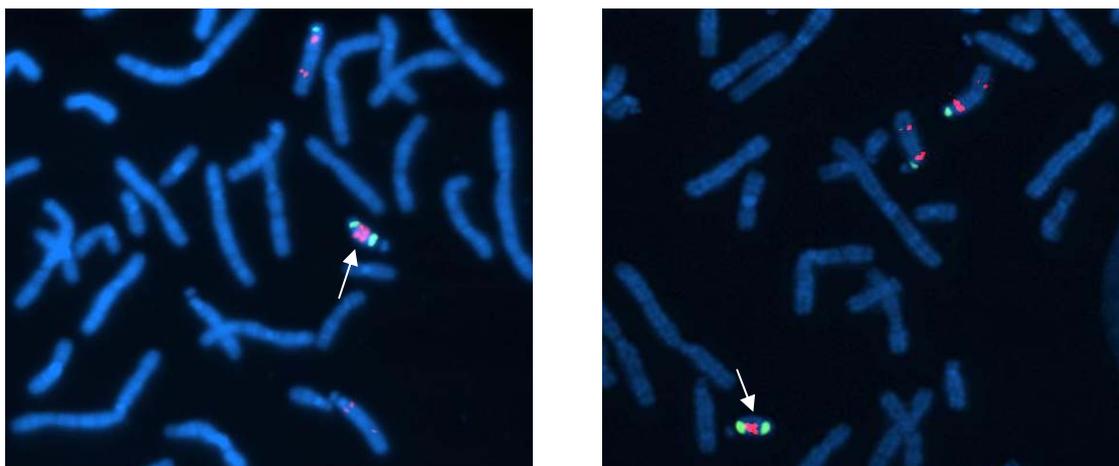


Figura 18: FISH em metafase da mãe do paciente 1 com as sondas **a)** UBE3A (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde) e **b)** SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho, centrómero a verde), para a região 15q11.2, mostrando a tetrasomia 15q11.2. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma derivativo

Caso 2

O caso 2 trata-se de uma criança do sexo feminino, com 4 anos, que se suspeitou através da bandagem GTG de uma alteração estrutural no cromossoma 15 (Figura 19). O resultado da FISH revelou, numa primeira análise, uma duplicação (2 sinais) da região 15q11.2 [46,XX.ish dup(15)(q11.2q11.2)(SNRPN++,UBE3A++)], (Figura 20). Quando este caso foi analisado por MS-MLPA, observou-se que os valores obtidos para os *ratios* da área relativa se encontravam mais elevados do que os valores estabelecidos para uma duplicação (≥ 1.3). Fazendo a média dos *ratios* para a triplicação observou-se que esta era de cerca de 1.95, um valor muito superior ao estabelecido para as duplicações (Tabela IV). Esta discrepância de resultados levou a uma re-hibridização com as sondas utilizadas na FISH. Durante a observação surgiram algumas situações dúbias que foram atentamente analisadas, considerando-se estar de facto, perante uma triplicação (3 sinais) desta região (Figura 21).

Face ao quadro clínico desta criança, prosseguiu-se a investigação, fazendo o estudo dos progenitores por citogenética convencional, FISH e MS-MLPA. Estes não apresentaram qualquer alteração, tratando-se de uma triplicação *de novo*.

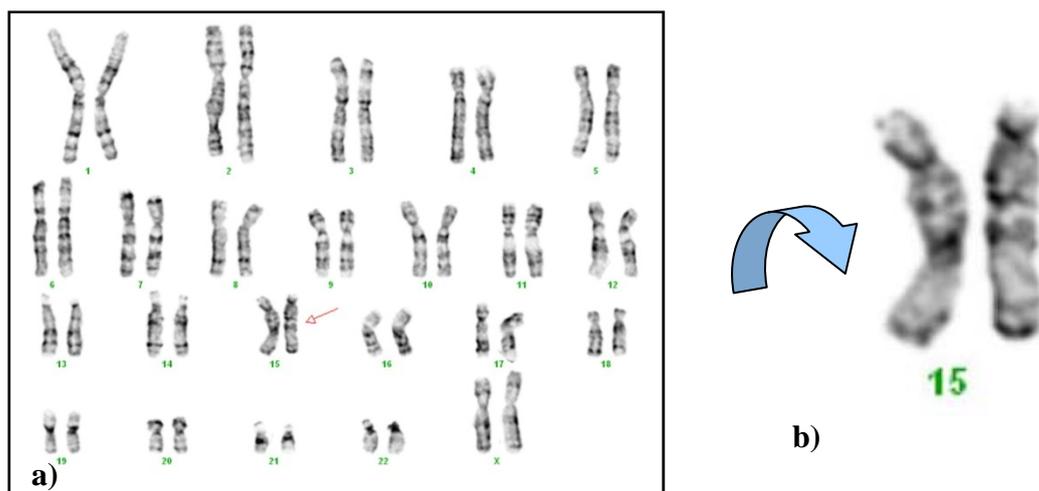


Figura 19: Caso 2: a) Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. b) Par de cromossomas 15 com a duplicação da região proximal no homólogo da direita.

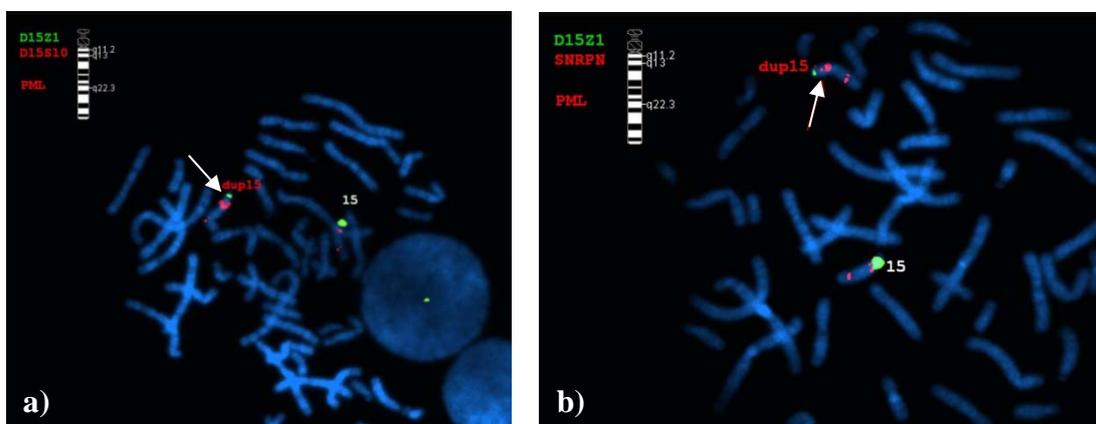


Figura 20: Caso 2: FISH em metafase com as sondas a) D15S10 (região crítica e região controlo a vermelho; centrómero a verde) e b) SNRPN (região crítica e região controlo a vermelho; centrómero a verde), para a região 15q11.2, do paciente 2, mostrando uma duplicação da região 15q11.2. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma duplicado.

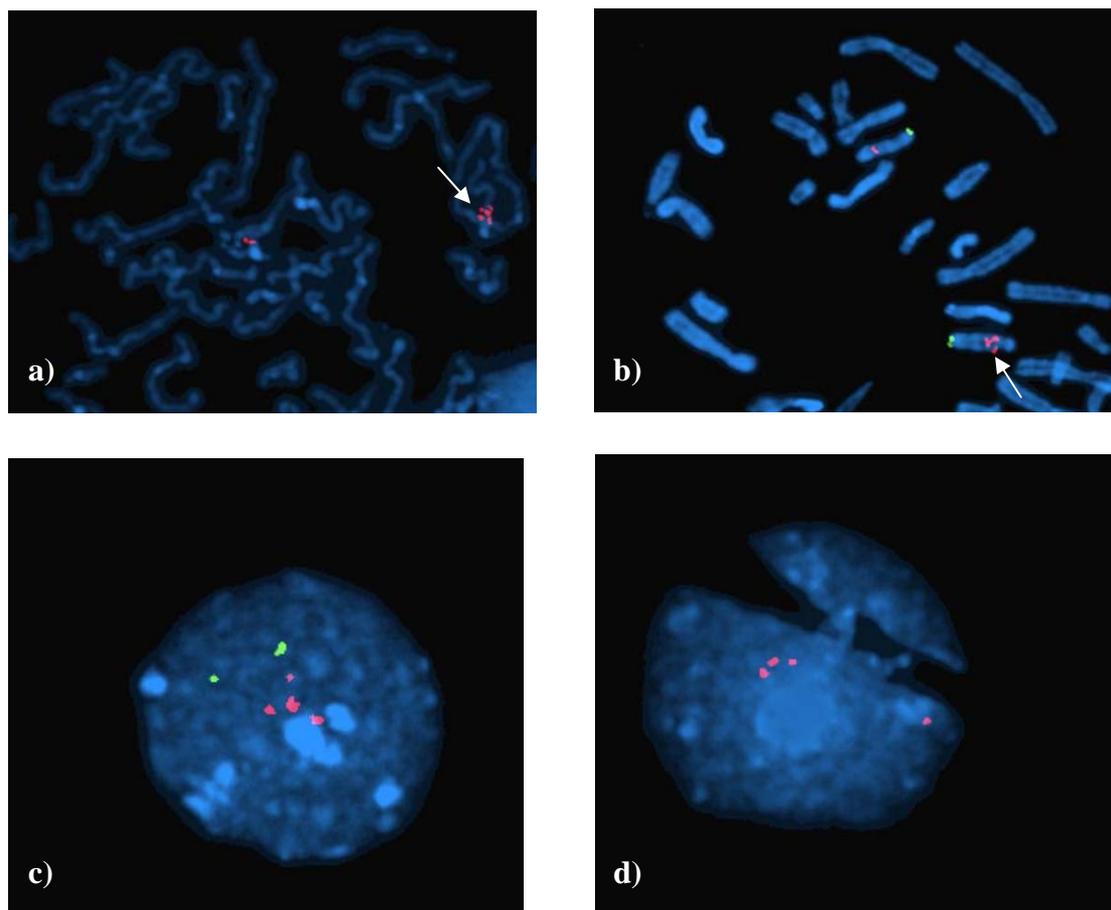


Figura 21: Caso 2: Re-hibridização pela FISH da região 15q11.2, com duas sondas, tanto em metafase (a-b), como em interfase (c-d), mostrando uma triplicação com **a)** sonda UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde), **b)** sonda SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde), **c)** sonda UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e **d)** sonda SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde). A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma com a triplicação.

Tabela IV: Resultados do paciente 2, com triplicação dos *loci* TUBGCP5, NIPA1, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 na região 15q11-q13, utilizando o *kit* SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente com duplicação (paciente 6) e de um paciente normal (paciente 20).

Paciente 6 Paciente 2 Paciente 20

Gene	Chr_pos	Length (nt)	MV36	Recommended	Order	Ratio	Ratio	Ratio
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	1		Normal (0.91)	Normal (1.13)	Normal (0.93)
NIPA1 probe 06249-L05755	15q11.2	433	15-020.6 NIPA1	2		Normal (1)	Gain (1.61)	Normal (0.97)
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11.2	154	15-020.4 TUBGCP5	3		Normal (0.93)	Ambiguous (1.33)	Normal (1.04)
MKRN3 probe 02020-L12922	15q11.2	173	15-021.4 MKRN3	4		Gain (1.4)	Gain (1.69)	Normal (0.98)
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11.2	409	15-021.4 MAGEL2	5		Gain (1.34)	Gain (2.08)	Normal (0.93)
NDN probe 11149-L11833	15q11.2	445	15-021.5 NDN	6		Ambiguous (1.9)	Ambiguous (2.13)	Normal (0.9)
NDN probe 04027-L13937	15q11.2	418	15-021.5 NDN	7		Gain (1.79)	Gain (2.35)	Normal (1.1)
SNRPN probe 11176-L11862	15q11.2	286	15-022.9 SNRPN	8		Gain (1.51)	Gain (1.69)	Normal (0.84)
SNRPN probe 12178-L13090	15q11.2	238	15-022.9 SNRPN	9		Gain (1.42)	Gain (1.95)	Normal (1.02)
SNRPN probe 12179-L13383	15q11.2	271	15-022.9 SNRPN	10		Gain (1.57)	Gain (2.01)	Normal (1.02)
SNRPN probe 12182-L13094	15q11.2	271	15-022.9 SNRPN	11		Gain (1.59)	Gain (2.05)	Normal (1.05)
SNRPN probe 02027-L12881	15q11.2	257	15-022.9 SNRPN	12		Gain (1.41)	Gain (1.65)	Normal (0.89)
SNRPN probe 12477-L13519	15q11.2	391	15-022.9 SNRPN	13		Gain (1.4)	Gain (1.87)	Normal (0.96)
SNRPN probe 11181-L11865	15q11.2	250	15-022.9 SNRPN	14		Gain (1.42)	Gain (1.76)	Normal (0.9)
SNRPN probe 04106-L13905	15q11.2	178	15-022.9 SNRPN	15		Gain (1.65)	Gain (1.65)	Normal (1.02)
SNRPN probe 04104-L04294	15q11.2	190	15-022.9 SNRPN	16		Gain (1.7)	Gain (1.68)	Normal (1.01)
SNRPN probe 04105-L02951	15q11.2	142	15-022.9 SNRPN	17		Gain (1.6)	Gain (1.7)	Normal (1.01)
SNRPN probe 01318-L13088	15q11.2	295	15-022.9 SNRPN	18		Gain (1.57)	Gain (1.86)	Normal (0.99)
SNRPN probe 11177-L11861	15q11.2	400	15-022.9 SNRPN	19		Gain (1.45)	Gain (2.1)	Normal (1.06)
SNRPN probe 12719-L13907	15q11.2	214	15-022.9 SNRPN	20		Gain (1.41)	Gain (2)	Normal (0.97)
SNRPN probe 12721-L13796	15q11.2	470	15-022.9 SNRPN	21		Gain (1.36)	Gain (2.3)	Normal (0.83)
SNRPN probe 12723-L13798	15q11.2	328	15-022.9 SNRPN	22		Gain (1.42)	Gain (2.09)	Normal (0.96)
UBE3A probe 02034-L12925	15q11.2	356	15-023.2 UBE3A Exon 13	23		Gain (1.46)	Gain (1.93)	Normal (1)
UBE3A probe 12082-L13474	15q11.2	301	15-023.2 UBE3A Exon 08	24		Gain (1.68)	Gain (2.19)	Normal (1.05)
UBE3A probe 04620-L00863	15q11.2	160	15-023.2 UBE3A Exon 07	25		Ambiguous (1.31)	Gain (1.8)	Normal (1.09)
UBE3A probe 10878-L11548	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	26		Gain (1.5)	Gain (2.19)	Normal (1.25)
UBE3A probe 10879-L11548	15q11.2	373	15-023.2 UBE3A Exon 06	27		Gain (1.41)	Gain (2.08)	Normal (1.08)
UBE3A probe 04641-L04293	15q11.2	184	15-023.2 UBE3A Exon 04	28		Gain (1.83)	Gain (1.6)	Normal (0.87)
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	364	15-023.6 ATP10A	29		Gain (1.42)	Gain (2.18)	Normal (0.94)
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023.6 ATP10A	30		Ambiguous (1.34)	Gain (1.99)	Normal (0.94)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3	32		Gain (1.45)	Gain (1.83)	Normal (1)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3	33		Gain (1.44)	Gain (2.28)	Normal (1)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	34		Normal (0.9)	Normal (0.98)	Normal (0.85)
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	35		Normal (1.22)	Normal (0.9)	Normal (0.88)
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	36		Normal (1.01)	Normal (0.99)	Normal (1.01)
Reference probe 08051-L07832	05p15	244	c	37		Normal (1.11)	Normal (0.95)	Normal (1.03)
Reference probe 09533-L09943	07q21	262	c	38		Normal (1.03)	Normal (1.04)	Normal (1.04)
Reference probe 09824-L10234	10q26	136	c	39		Normal (1.12)	Normal (1.12)	Normal (0.99)
Reference probe 08947-L08642	11p15	454	c	40		Normal (0.94)	Normal (1.11)	Normal (0.88)
Reference probe 08596-L00020	11q13	130	c	41		Normal (1.1)	Normal (1.07)	Normal (1)
Reference probe 08078-L07799	11q24	319	c	42		Normal (1.1)	Normal (0.98)	Normal (1.02)
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	43		Normal (0.93)	Normal (0.94)	Normal (1)
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	44		Normal (1)	Normal (0.93)	Normal (0.87)
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	45		Normal (1.05)	Normal (1.05)	Normal (1)
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	46		Normal (1.15)	Normal (0.94)	Normal (1.09)
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	47		Normal (0.9)	Normal (1.11)	Normal (0.97)
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	48		Normal (0.97)	Normal (1.1)	Normal (0.96)
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	49		Normal (0.99)	Normal (0.98)	Normal (0.93)

Caso 3

O paciente 3, um menino de 8 anos, revelou por citogenética convencional a existência de um mosaico com 3 linhas celulares, uma normal 46,XY (60%), outra com um anel supranumerário (39%) e uma terceira com um anel duplicado supranumerário (1%), (Figura 22). A FISH identificou em 39% das metafases e interfases o anel como derivado do cromossoma 15, utilizando uma sonda centromérica (Figura 23 a e b). No entanto, este anel não abrange a região crítica 15q11.2, não hibridizando com as sondas para os *loci* UBE3A e SNRPN (Figura 23 c e d). Assim, este estudo revelou um cariótipo mos 47,XY,+r.ish r(15)(D15Z4+,SNRPN-,UBE3A-)[69]/r(15)(D15Z4++,SNRPN-,UBE3A-)[2]/46,XY[105]. Este caso foi ainda estudado pela genética molecular, recorrendo à MS-MLPA que detectou uma amplificação equivalente à região envolvida no anel supranumerário. As sondas localizadas logo abaixo do centrómero apresentaram amplificação, com valores correspondentes a uma duplicação, nomeadamente nas sondas TUBGCP5, MKRN3, NDN, e MAGEL2, e foi também confirmada a ausência das sondas UBE3A e SNRPN (Tabela V).

Para completar o estudo, foram analisados os pais deste paciente pelas mesmas técnicas, revelando uma alteração na mãe deste paciente. Foi encontrado um mosaico com duas linhas celulares, uma normal 46,XX e outra com um anel supranumerário (Figura 24). Este mosaico é de menor percentagem, em relação ao encontrado no filho. Deste modo, obteve-se o seguinte cariótipo mos 47,XX+r.ish (15)(D15Z4+,SNRPN-,UBE3A-)[10]/46,XX[32]. Para complementar esta análise, aplicou-se a MS-MLPA ao DNA materno, não se revelando qualquer tipo de alteração, provavelmente devido à baixa percentagem em que se encontra o mosaico (Tabela V).

Face a estes resultados, é provável que este mosaico não seja, por si só, a causa do autismo na criança.

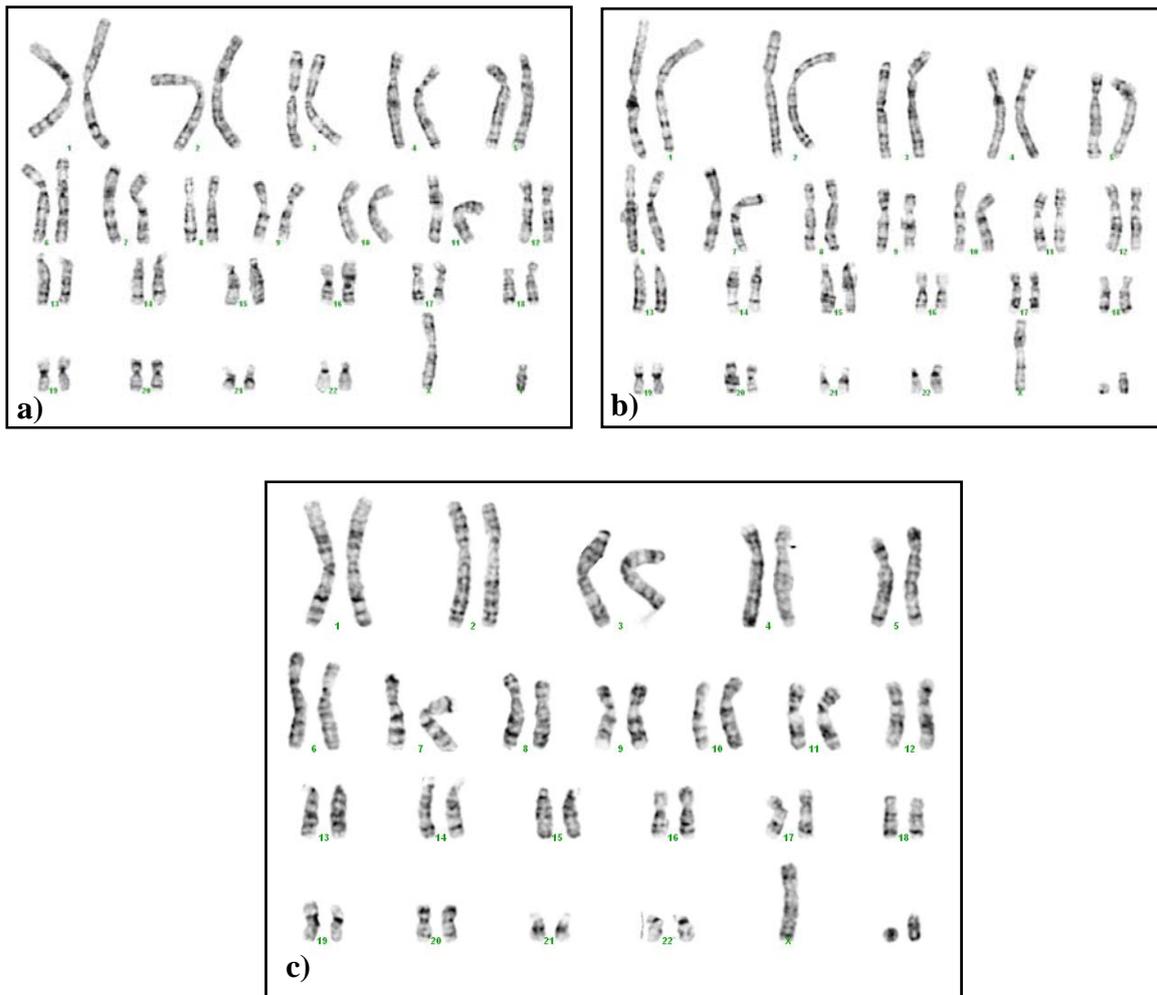


Figura 22: Caso 3: Cariótipo, com bandas GTG, do paciente 3, mostrando a) uma linha celular normal 46,XY, b) uma linha celular com um anel supranumerário, c) uma linha celular com anel duplicado supranumerário.

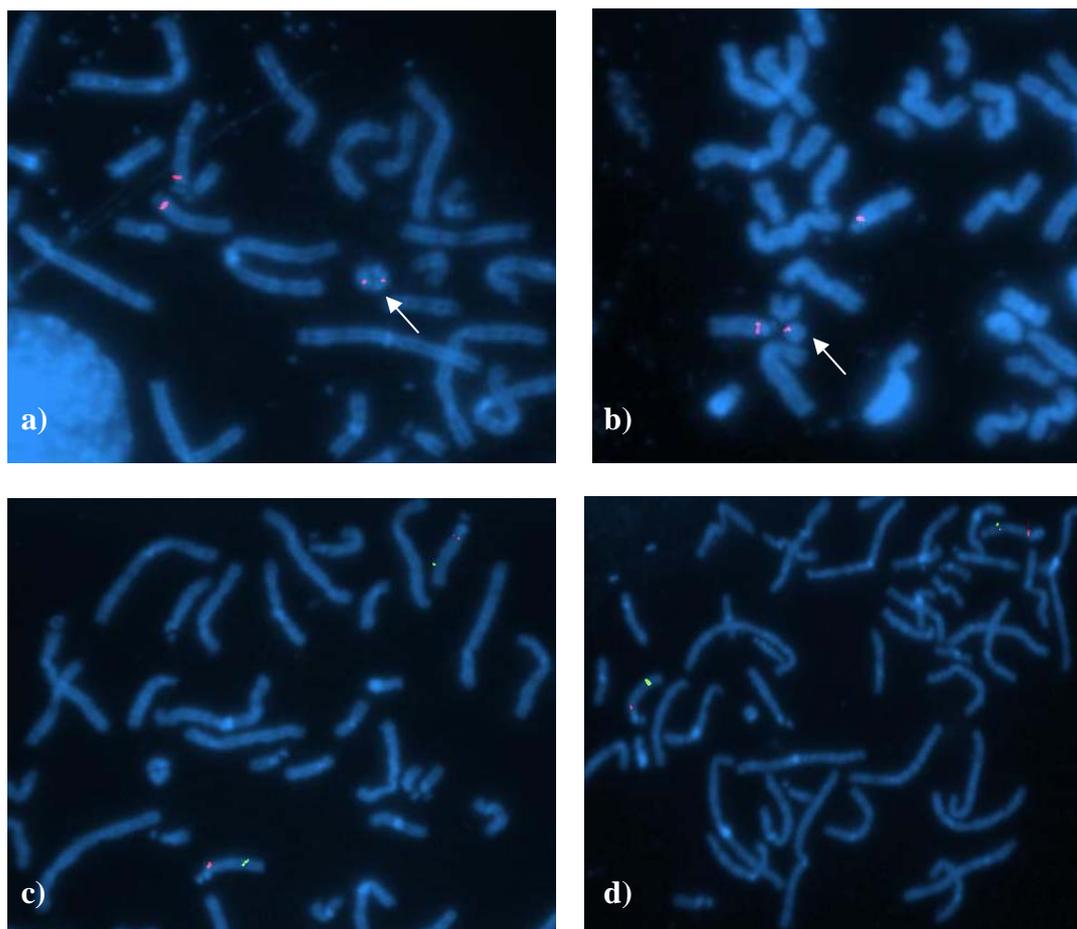


Figura 23: Caso 3: FISH em metafase com a sonda D15Z4, em que se observa um anel supranumerário (a) e um anel duplicado supranumerário (b). Hibridização com as sondas c) UBE3A (região crítica a vermelho; centrómero a verde) e d) SNRPN (região crítica a vermelho; centrómero a verde). O anel derivado do cromossoma 15 não abrange a região crítica 15q11.2 (SNRPN-, UBE3A-). A seta indica a hibridização da sonda D15Z4 no cromossoma marcador.

Tabela V: Resultados de MLPA, utilizando o kit SALSA ME028, **a)** do paciente 3, com o anel supranumerário para os *loci* TUBGCP5, MKRN3, MAGEL2 e NDN na região 15q11-q13, **b)** da mãe deste paciente, em que todas as sondas apresentam um padrão normal.

a)

Gene	Chr_pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio	Ratio
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	1	Normal (0,95)	Normal (0,97)
NIP A1 probe 06249-L05755	15q11.2	433	15-020.6 NIP A1	2	Normal (1,17)	Normal (1,06)
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11.2	454	15-020.4 TUBGCP5	3	Gain (1,73)	Normal (1,09)
MKRN3 probe 02020-L12922	15q11.2	173	15-021.4 MKRN3	4	Gain (1,84)	Normal (1,07)
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11.2	409	15-021.4 MAGEL2	5	Gain (1,31)	Normal (1,01)
NDN probe 11149-L11833	15q11.2	445	15-021.5 NDN	6	Ambiguous (1,91)	Normal (1,11)
NDN probe 04027-L13937	15q11.2	418	15-021.5 NDN	7	Gain (1,63)	Normal (1,11)
SNRPN probe 11178-L11862	15q11.2	286	15-022.9 SNRPN	8	Normal (1,17)	Normal (1,05)
SNRPN probe 12178-L13090	15q11.2	238	15-022.9 SNRPN	9	Normal (1,15)	Normal (1,02)
SNRPN probe 12179-L13383	15q11.2	277	15-022.9 SNRPN	10	Normal (1,09)	Normal (1,03)
SNRPN probe 12182-L13094	15q11.2	271	15-022.9 SNRPN	11	Normal (1,19)	Normal (1)
SNRPN probe 02027-L12881	15q11.2	257	15-022.9 SNRPN	12	Normal (1,01)	Normal (0,95)
SNRPN probe 12477-L13519	15q11.2	391	15-022.9 SNRPN	13	Normal (0,99)	Normal (1)
SNRPN probe 11181-L11865	15q11.2	250	15-022.9 SNRPN	14	Normal (1)	Normal (0,92)
SNRPN probe 04106-L13905	15q11.2	178	15-022.9 SNRPN	15	Normal (1)	Normal (1)
SNRPN probe 04104-L04294	15q11.2	190	15-022.9 SNRPN	16	Normal (1,15)	Normal (0,96)
SNRPN probe 04103-L02951	15q11.2	142	15-022.9 SNRPN	17	Normal (0,97)	Normal (0,95)
SNRPN probe 01318-L13088	15q11.2	295	15-022.9 SNRPN	18	Normal (1,1)	Normal (0,99)
SNRPN probe 11177-L11861	15q11.2	400	15-022.9 SNRPN	19	Normal (0,99)	Normal (0,97)
SNRPN probe 12719-L13907	15q11.2	214	15-022.9 SNRPN	20	Normal (1,14)	Normal (1,04)
SNRPN probe 12721-L13796	15q11.2	470	15-022.9 SNRPN	21	Normal (0,83)	Normal (0,94)
SNRPN probe 12723-L13798	15q11.2	328	15-022.9 SNRPN	22	Normal (1,04)	Normal (1)
UBE3A probe 02034-L12925	15q11.2	356	15-023.2 UBE3A Exon 13	23	Normal (0,94)	Normal (0,99)
UBE3A probe 12082-L13474	15q11.2	301	15-023.2 UBE3A Exon 08	24	Normal (1,06)	Normal (1)
UBE3A probe 04620-L00863	15q11.2	160	15-023.2 UBE3A Exon 07	25	Normal (1,2)	Normal (1,07)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	26	Normal (0,99)	Normal (1,03)
UBE3A probe 10878-L11548	15q11.2	373	15-023.2 UBE3A Exon 05	27	Normal (1,1)	Normal (1,06)
UBE3A probe 04641-L04293	15q11.2	184	15-023.2 UBE3A Exon 04	28	Normal (1,14)	Normal (0,89)
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	364	15-023.6 ATP10A	29	Normal (1)	Normal (0,98)
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023.6 ATP10A	30	Normal (0,93)	Normal (0,97)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3	32	Normal (1,05)	Normal (1,01)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3	33	Normal (1,09)	Normal (1,03)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	34	Normal (0,86)	Normal (0,95)
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	35	Normal (1,17)	Normal (0,9)
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	36	Normal (0,94)	Normal (1,02)
Reference probe 08051-L07832	05p15	244	c	37	Normal (1,06)	Normal (1,09)
Reference probe 09533-L09943	07q21	262	c	38	Normal (0,95)	Normal (1,07)
Reference probe 09824-L10234	10q26	136	c	39	Normal (0,99)	Normal (0,97)
Reference probe 08947-L09042	11p15	454	c	40	Normal (1,05)	Normal (0,96)
Reference probe 03896-L00020	11q13	130	c	41	Normal (1,08)	Normal (1)
Reference probe 08018-L07799	11q24	319	c	42	Normal (1,14)	Normal (1,04)
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	43	Normal (1,12)	Normal (1)
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	44	Normal (0,97)	Normal (0,94)
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	45	Normal (0,89)	Normal (0,96)
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	46	Normal (1,09)	Normal (1,05)
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	47	Normal (0,87)	Normal (1,02)
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	48	Normal (1,03)	Normal (0,98)
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	49	Normal (0,97)	Normal (0,97)

b)

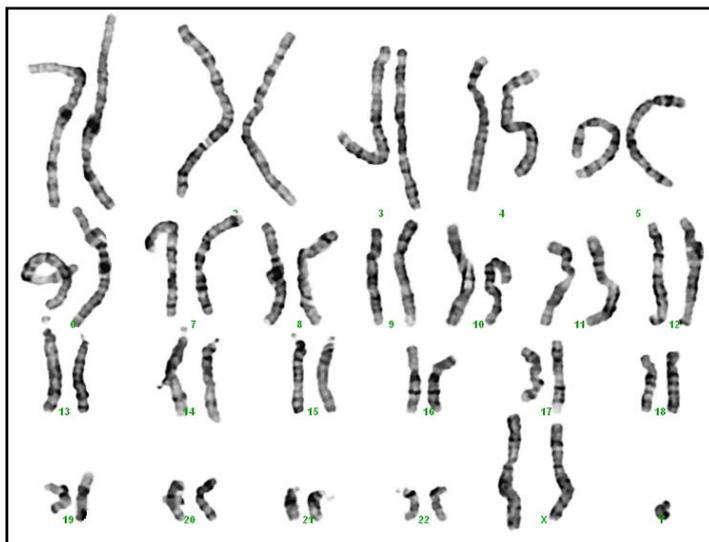


Figura 24: Caso 3: Cariótipo mos 47,XX+r(15), por bandas GTG, da mãe do paciente 3, mostrando um cromossoma extra marcador, semelhante ao observado na linha predominante do filho (Figura 22).

Caso 4

A análise do cariótipo do paciente 4, um menino de 11 anos, revelou uma alteração estrutural num dos cromossomas 15 (Figura 25). Esta foi caracterizada pela FISH, observando-se uma duplicação (dois sinais) na região 15q11.2, [46,XX.ish dup(15)(q11.2q11.2)(SNRPN++,UBE3A++)], (Figura 26). Este paciente foi caracterizado por MS-MLPA que corroborou os resultados anteriores, e permitiu observar que as sondas para os *loci*, MKRN3, MAGEL2, ATP10A e GABRB3 também estavam duplicadas (Tabela VI).

De modo a determinar a origem desta alteração, foram estudados a mãe e o irmão desta criança, que mostraram resultados normais, tanto pela FISH como pela MS-MLPA (Tabela VI). Não foi possível concluir se este rearranjo é *de novo* ou familiar, uma vez que, não foi estudado o pai.

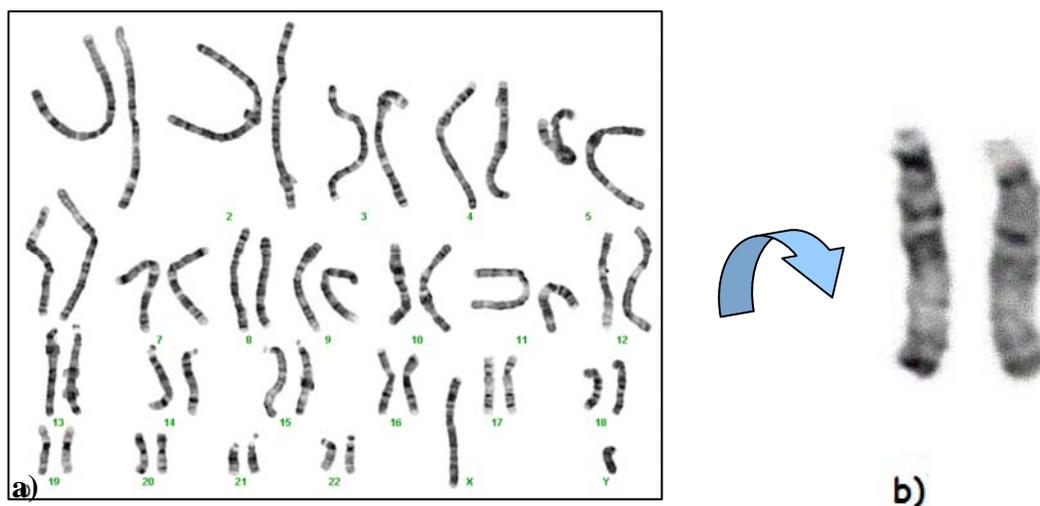


Figura 25: Caso 4: **a)** Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. **b)** Par de cromossomas 15 com a duplicação da região proximal no homólogo da direita.

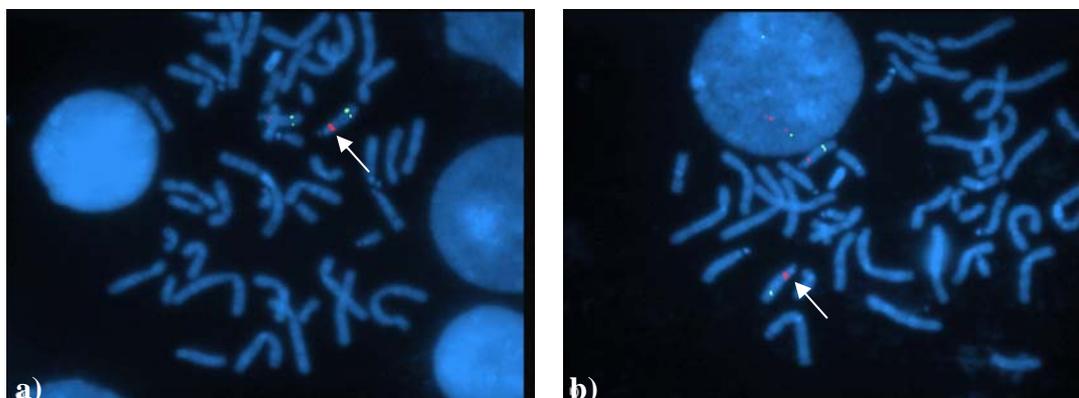


Figura 26: Caso 4: FISH em metafase com as sondas **a)** UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e **b)** SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde), para a região 15q11.2, do paciente 4, mostrando uma duplicação desta região. A seta indica a hibridização das sondas no cromossoma com a duplicação.

Tabela VI: Resultados de MLPA, utilizando o *kit* SALSA ME028, em que todas as sondas apresentam um padrão normal, tanto no irmão (a) como na mãe (c) e do paciente 4 (b), em que as sondas para os *loci*, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 estão duplicados.

Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	a)			b)			c)		
					Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	1	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,12)	
NIPAI1 probe 06249-L05755	15q11.2	433	15-020.6 NIPAI1	2	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (0,96)	Normal (0,91)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1)	
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11.2	154	15-020.4 TUBGCP5	3	Normal (0,95)	Normal (0,95)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,17)	Normal (1,17)	Normal (1,17)	
MKRN3 probe 02020-L12922	15q11.2	173	15-021.4 MKRN3	4	Normal (0,88)	Normal (0,88)	Gain (1,43)	Gain (1,43)	Gain (1,43)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11.2	409	15-021.4 MAGEL2	5	Normal (0,95)	Normal (0,95)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	
NDN probe 11149-L11833	15q11.2	445	15-021.5 NDN	6	Normal (1)	Normal (1)	Ambiguous (1,44)	Ambiguous (1,44)	Ambiguous (1,44)	Normal (1,1)	Normal (1,1)	Normal (1,1)	
NDN probe 04027-L13937	15q11.2	418	15-021.5 NDN	7	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Gain (1,57)	Gain (1,57)	Gain (1,57)	Normal (1,17)	Normal (1,17)	Normal (1,17)	
SNRPN probe 11178-L11862	15q11.2	286	15-022.9 SNRPN	8	Normal (0,87)	Normal (0,87)	Normal (1,29)	Normal (1,29)	Normal (1,29)	Normal (0,92)	Normal (0,92)	Normal (0,92)	
SNRPN probe 12178-L13090	15q11.2	238	15-022.9 SNRPN	9	Normal (0,94)	Normal (0,94)	Gain (1,5)	Gain (1,5)	Gain (1,5)	Normal (1,19)	Normal (1,19)	Normal (1,19)	
SNRPN probe 12179-L13383	15q11.2	277	15-022.9 SNRPN	10	Normal (1)	Normal (1)	Gain (1,51)	Gain (1,51)	Gain (1,51)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	
SNRPN probe 12182-L13094	15q11.2	271	15-022.9 SNRPN	11	Normal (0,88)	Normal (0,88)	Gain (1,45)	Gain (1,45)	Gain (1,45)	Normal (1,05)	Normal (1,05)	Normal (1,05)	
SNRPN probe 02027-L12881	15q11.2	257	15-022.9 SNRPN	12	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	
SNRPN probe 12477-L13519	15q11.2	391	15-022.9 SNRPN	13	Normal (0,93)	Normal (0,93)	Gain (1,3)	Gain (1,3)	Gain (1,3)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	
SNRPN probe 11181-L11865	15q11.2	250	15-022.9 SNRPN	14	Normal (0,89)	Normal (0,89)	Gain (1,36)	Gain (1,36)	Gain (1,36)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	
SNRPN probe 04106-L13905	15q11.2	178	15-022.9 SNRPN	15	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Gain (1,48)	Gain (1,48)	Gain (1,48)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	
SNRPN probe 04104-L04294	15q11.2	190	15-022.9 SNRPN	16	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Gain (1,52)	Gain (1,52)	Gain (1,52)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	
SNRPN probe 04103-L02951	15q11.2	142	15-022.9 SNRPN	17	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Gain (1,5)	Gain (1,5)	Gain (1,5)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	
SNRPN probe 01318-L13088	15q11.2	295	15-022.9 SNRPN	18	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Gain (1,48)	Gain (1,48)	Gain (1,48)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	
SNRPN probe 11177-L11861	15q11.2	400	15-022.9 SNRPN	19	Normal (1)	Normal (1)	Gain (1,47)	Gain (1,47)	Gain (1,47)	Normal (1,13)	Normal (1,13)	Normal (1,13)	
SNRPN probe 12719-L13907	15q11.2	214	15-022.9 SNRPN	20	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Gain (1,46)	Gain (1,46)	Gain (1,46)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	
SNRPN probe 12721-L13796	15q11.2	470	15-022.9 SNRPN	21	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Ambiguous (1,31)	Ambiguous (1,31)	Ambiguous (1,31)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	
SNRPN probe 12723-L13798	15q11.2	328	15-022.9 SNRPN	22	Normal (0,94)	Normal (0,94)	Gain (1,44)	Gain (1,44)	Gain (1,44)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	
UBE3A probe 02034-L12925	15q11.2	356	15-023.2 UBE3A Exon 13	23	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Gain (1,39)	Gain (1,39)	Gain (1,39)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	
UBE3A probe 12082-L13474	15q11.2	301	15-023.2 UBE3A Exon 08	24	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Gain (1,57)	Gain (1,57)	Gain (1,57)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	
UBE3A probe 04620-L00863	15q11.2	160	15-023.2 UBE3A Exon 07	25	Normal (0,88)	Normal (0,88)	Gain (1,4)	Gain (1,4)	Gain (1,4)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	
UBE3A probe 10878-L11548	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	26	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Gain (1,67)	Gain (1,67)	Gain (1,67)	Normal (1,11)	Normal (1,11)	Normal (1,11)	
UBE3A probe 04641-L04293	15q11.2	373	15-023.2 UBE3A Exon 05	27	Normal (0,92)	Normal (0,92)	Gain (1,42)	Gain (1,42)	Gain (1,42)	Normal (0,92)	Normal (0,92)	Normal (0,92)	
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	184	15-023.2 UBE3A Exon 01	28	Normal (0,83)	Normal (0,83)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Gain (1,38)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023.6 ATP10A	29	Normal (0,92)	Normal (0,92)	Ambiguous (1,37)	Ambiguous (1,37)	Ambiguous (1,37)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-023.6 ATP10A	30	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Gain (1,55)	Gain (1,55)	Gain (1,55)	Normal (1,01)	Normal (1,01)	Normal (1,01)	
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3	32	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Gain (1,49)	Gain (1,49)	Gain (1,49)	Normal (1,12)	Normal (1,12)	Normal (1,12)	
GABRB3 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-024.5 GABRB3	33	Normal (0,95)	Normal (0,95)	Normal (0,87)	Normal (0,87)	Normal (0,87)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	
APBA2 probe 01709-L12924	15q13.1	348	15-027.1 APBA2	34	Normal (0,92)	Normal (0,92)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	35	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	36	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (1,08)	Normal (1,08)	Normal (1,08)	Normal (1,01)	Normal (1,01)	Normal (1,01)	
Reference probe 08051-L07832	02p15	244	c	37	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (1,05)	Normal (1,05)	Normal (1,05)	
Reference probe 09533-L09843	07q21	262	c	38	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1)	
Reference probe 08947-L10234	10q26	136	c	39	Normal (0,88)	Normal (0,88)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (1,04)	
Reference probe 08947-L09042	11p15	454	c	40	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1,06)	Normal (1,06)	Normal (1,06)	
Reference probe 08018-L07799	11q13	130	c	41	Normal (0,9)	Normal (0,9)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (1)	Normal (0,95)	Normal (0,95)	Normal (0,95)	
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	42	Normal (1,01)	Normal (1,01)	Normal (0,93)	Normal (0,93)	Normal (0,93)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	43	Normal (0,99)	Normal (0,99)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Normal (1,07)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	44	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (1,06)	Normal (1,06)	Normal (1,06)	
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	45	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (1,08)	Normal (1,08)	Normal (1,08)	
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	46	Normal (1,01)	Normal (1,01)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,97)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	Normal (0,98)	
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	48	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (0,91)	Normal (0,91)	Normal (0,91)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	49	Normal (1,04)	Normal (1,04)	Normal (0,91)	Normal (0,91)	Normal (0,91)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	

Caso 5

O paciente 5, uma criança autista, de 6 anos, com atraso de desenvolvimento, apresentava uma alteração na região crítica 15q11.2, que foi encontrada pela citogenética clássica (Figura 27).

O resultado da FISH confirmou a triplicação (três sinais) da região 15q11.2 [46,XX.ish trp(15)(q11.2q11.2)(SNRPN+++ ,UBE3A+++)], (Figura 28) e o mesmo resultado foi obtido pela MS-MLPA que permitiu observar que as sondas para os *loci* TUBGCP5, CYFIP1, MKRN3, MAGEL2, ATP10A, GABRB3, OCA2 e APBA2 também estavam duplicadas (Tabela VII).

Os pais da menina foram também estudados pela citogenética e pela FISH, não se encontrando qualquer alteração, tratando-se portanto, de um rearranjo estrutural *de novo* na criança, o que sugere que esta alteração seja a causa do autismo.

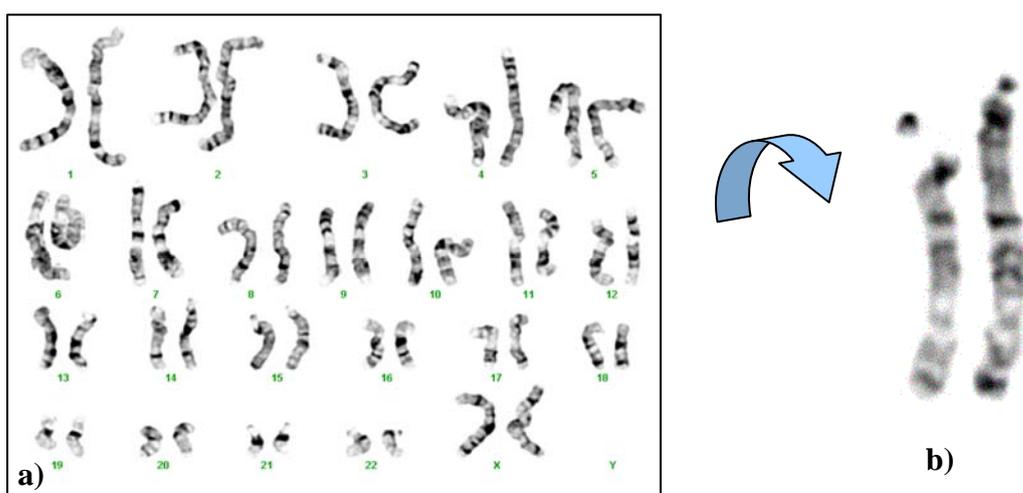


Figura 27: Caso 5: **a)** Cariótipo, com bandas GTG, mostrando num dos homólogos um aumento na região proximal do cromossoma 15. **b)** Par de cromossomas 15 com a triplicação da região proximal no homólogo da direita.

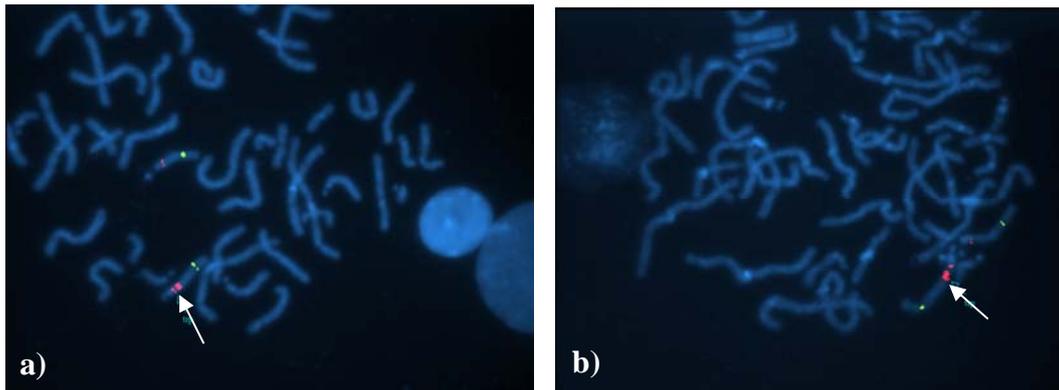


Figura 28: Caso 5: FISH em metafase com as sondas **a)** UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e **b)** SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde), para a região 15q11.2, do paciente 5, mostrando uma triplicação da região 15q11.2. A seta indica a hibridização com as sondas no cromossoma com a triplicação.

Caso 6

O caso 6 trata-se de uma criança do sexo masculino, com 4 anos de idade que aparentemente apresentava um cariótipo normal por bandagem GTG (Figura 29). Todavia, a FISH evidenciou uma duplicação (dois sinais) da região crítica para as síndromes de PWS e AS. [46,XY.ish dup(15)(q11.2q11.2)(SNRPN++,UBE3A++)], (Figura 30).

A análise por MS-MLPA veio confirmar a alteração encontrada por citogenética molecular e permitiu observar que as sondas para os *loci*, MKRN3, MAGEL2, ATP10A e GABRB3 também estavam duplicadas (Tabela VIII).

Para se identificar a origem desta alteração era necessário o estudo dos pais, o que não se pôde realizar, uma vez que se tratava de uma criança adoptada.

Tabela VII: Resultados do paciente 5, com triplicação dos *loci* TUBGCP5, CYFIPI, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A, GABRB3, OCA2 e APBA2 na região 15q11-q13, utilizando o *kit* SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente normal (Paciente 12).

Paciente 12 Paciente 5

Gene	Chr pos	Length (bp)	MV35	Recommended Order	Ratio	Ratio
TUBGCP1 probe 2018-L0865	TUBGCP1	154	15-020.5 TUBGCP1	1	Normal (1,04)	Gain (1,57)
CYFIPI1 probe M2016-L1317	CYFIPI1	136	15-020.5 CYFIPI1	2	Normal (1,01)	Gain (1,42)
MKRN3 probe 4801-L4285	MKRN3 promoter	209	15-021.36 MKRN3 100%	3	Normal (1,03)	Gain (1,79)
MKRN3 probe 2020-L1539	MKRN3 exon 1	172	15-021.36 MKRN3	4	Normal (0,93)	Gain (1,83)
MAGEL2 probe 2022-L4296	MAGEL2 exon 1	196	15-021.44 MAGEL2	5	Normal (0,93)	Gain (1,82)
MAGEL2 probe 2021-L1540	MAGEL2 (promoter)	178	15-021.44 MAGEL2 100%	6	Normal (1,01)	Gain (1,79)
NDN probe 3838-L1542	NDN exon 1	319	15-021.48 NDN	7	Normal (1,13)	Gain (2,18)
NDN probe 4027-L1541	NDN exon 1	418	15-021.5 NDN 50% (imprinted)	8	Normal (1,04)	Gain (2,02)
SNRPN probe 3835-L1543	SNRPN UTB exon	247	15-022.8 SNRPN 50% (imprinted)	9	Normal (0,95)	Gain (1,98)
SNRPN probe 2027-L0861	SNRPN U3 exon	256	15-022.8 SNRPN	10	Normal (0,96)	Gain (1,66)
SNRPN probe 4106-L1545	SNRPN alt exon 1	166	15-022.8 SNRPN 50% (imprinted)	11	Normal (0,99)	Gain (1,71)
SNRPN probe 4104-L4294	SNRPN (CpG island)	190	15-022.8 SNRPN 50% (imprinted)	12	Normal (1,01)	Gain (1,48)
SNRPN probe IM4103-L2951	SNRPN (CpG island)	142	15-022.8 SNRPN 50% (imprinted)	13	Normal (0,98)	Gain (1,66)
SNRPN probe 1318-L1790	SNRPN exon 3	292	15-022.8 SNRPN	14	Normal (1,05)	Gain (2,22)
UBE3A probe 2034-L0864	UBE3A exon 15	355	15-023.2 UBE3A	15	Normal (1)	Gain (1,65)
UBE3A probe 4620-L0863	UBE3A exon 1	160	15-023.2 UBE3A	16	Normal (1,02)	Gain (1,66)
UBE3A probe 4642-L4295	UBE3A exon 1	400	15-023.1 UBE3A 0%	17	Normal (1,07)	Gain (1,7)
UBE3A probe 4641-L4293	UBE3A exon 1	184	15-023.1 UBE3A 0%	18	Normal (1,16)	Gain (1,55)
ATP10A probe 2036-L1550	ATP10A exon 2	382	15-023.6 ATP10A	19	Normal (1,06)	Gain (1,68)
ATP10A probe 2035-L4298	ATP10A exon 1	364	15-023.6 ATP10A 0%	20	Normal (1,13)	Gain (1,78)
GABRB3 probe 1315-L0868	GABRB3 exon 9	220	15-024.5 GABRB3	21	Normal (1,1)	Gain (2,23)
GABRB3 probe 2038-L2330	GABRB3 exon 1	409	15-024.5 GABRB3 0%	22	Normal (1,01)	Gain (1,95)
OCA2 probe 2040-L1553	OCA2 exon 22	436	15-025.8 OCA2	23	Normal (0,94)	Gain (2,14)
OCA2 probe 2041-L3725	OCA2 exon 1	445	15-025.8 OCA2 0%	24	Normal (1,04)	Gain (2,18)
APBA2 probe 1314-L0867	APBA2 gene	202	15-027.1 APBA2	25	Normal (1,03)	Gain (1,97)
Control probe 2072-L1127	Chr. 13q12	148	0% (digestion control)	26	Normal (0,93)	Normal (1,22)
Control probe 1709-L1276	Chr. 15q26	346	0% (digestion control)	27	Normal (1,05)	Normal (1,08)
Control probe 2260-L1747	Chr. 3p22	463	0% (digestion control)	28	Normal (0,99)	Normal (0,9)
Control probe 0797-L0463	Chr. 5q31	130	c	29	Normal (1,04)	Normal (1,04)
Control probe 2264-L1750	Chr. 3p25	229	c	30	Normal (0,92)	Normal (1,11)
Control probe 3365-L2749	Chr. 6q26	238	c	31	Normal (1,05)	Normal (1,08)
Control probe 1225-L0776	Chr. 10p15	265	c	32	Normal (1)	Normal (1,12)
Control probe 3249-L4292	Chr. 13q14	274	c	33	Normal (1,01)	Normal (0,99)
Control probe 2138-L1631	Chr. 3p25	283	c	34	Normal (1,02)	Normal (0,98)
Control probe 1327-L0872	Chr. 17p13	301	c	35	Normal (1)	Normal (1)
Control probe 1576-L1148	Chr. 22q12	310	c	36	Normal (0,99)	Normal (0,98)
Control probe 0778-L0347	Chr. 17q21	328	c	37	Normal (1)	Normal (1)
Control probe 1590-L1162	Chr. 13q14	337	c	38	Normal (1,13)	Normal (1,13)
Control probe 1235-L0773	Chr. 22q11	373	c	39	Normal (1)	Normal (0,98)
Control probe 0478-L0061	Chr. 14q13	391	c	40	Normal (1)	Normal (1,23)
Control probe 1924-L8393	Chr. 17p13	427	c	41	Normal (0,97)	Normal (1,15)
Control probe 0605-L0018	Chr. 15q26	454	c	42	Normal (1,04)	Normal (0,97)
Control probe 3884-L3254	Chr. 2p16	472	c	42	Normal (1,08)	Normal (0,79)

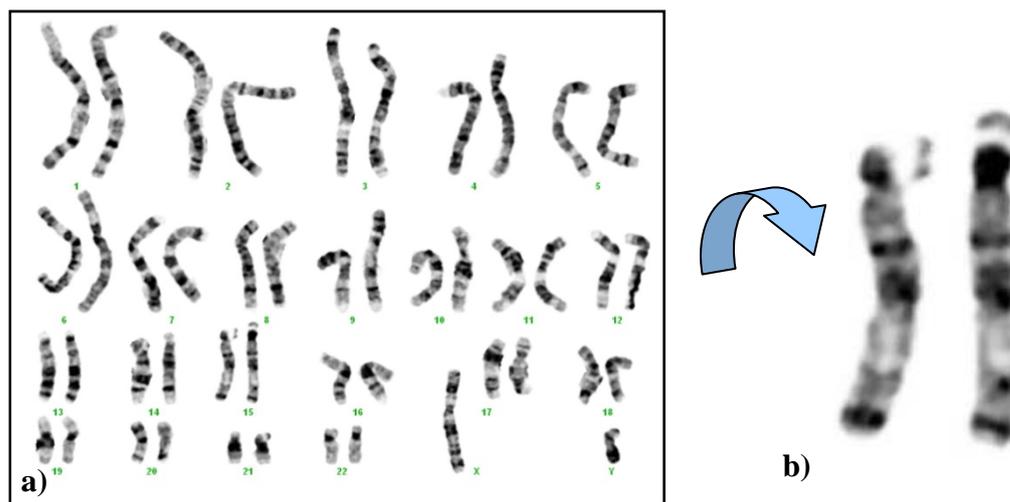


Figura 29: Caso 6: **a)** Cariótipo com bandas GTG, sem alterações estruturais na região proximal nos cromossomas 15 do par de homólogos. **b)** Par de homólogos 15 sem alteração da região proximal.

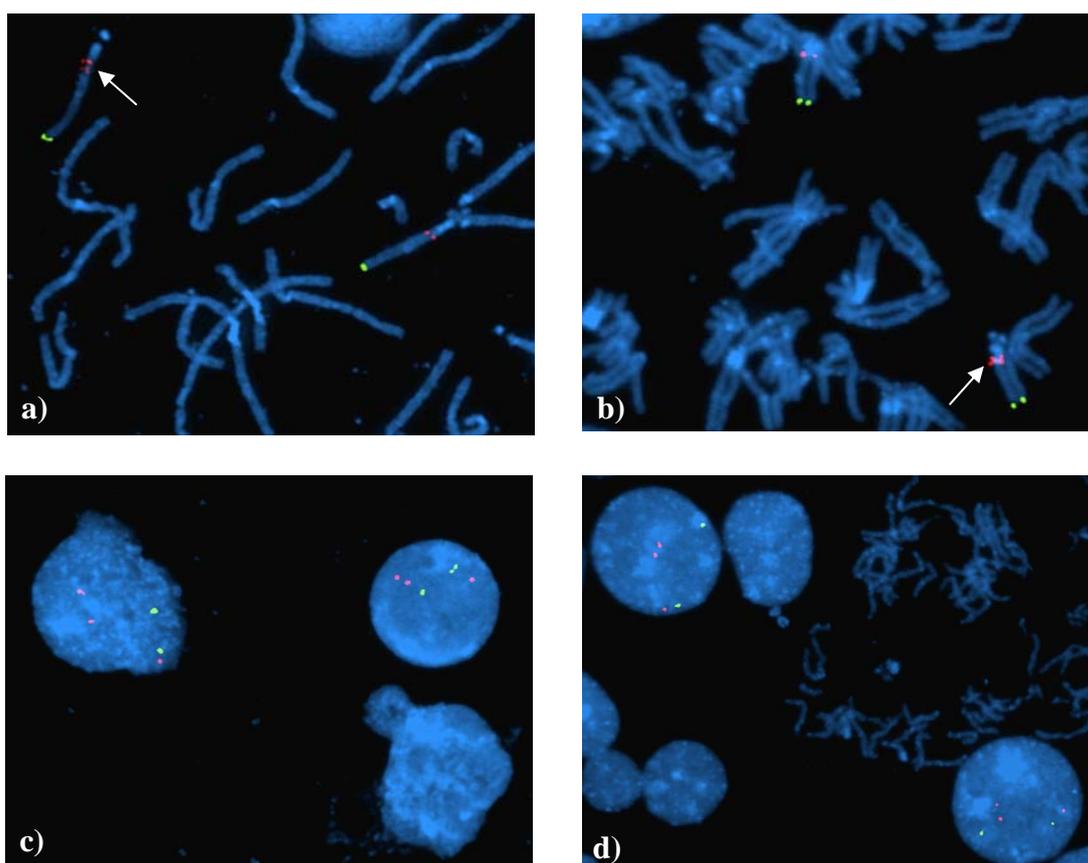


Figura 30: Caso 6: Hibridização pela FISH da região 15q11.2, com duas sondas, tanto em metafase (**a-b**), como em interfase (**c-d**), mostrando uma duplicação com **a)** sonda UBE3A, **b)** sonda SNRPN, **c)** sonda UBE3A e **d)** sonda SNRPN. A seta indica a hibridização com as sondas no cromossoma com a duplicação.

Tabela VIII: Resultados do paciente 6, com duplicação dos *loci* MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A e GABRB3 na região 15q11-q13, utilizando o *kit* SALSA ME028. É feita uma comparação com o DNA de um paciente normal (Paciente 52).

Paciente 6 Paciente 52

Gene	Chr_pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio	Ratio
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	1	Normal (0,97)	Normal (0,97)
NIPAI1 probe 06249-L05755	15q11,2	433	15-020.6 NIPAI1	2	Normal (1)	Normal (0,91)
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11,2	154	15-020.4 TUBGCP5	3	Normal (0,93)	Normal (1,19)
MKRN3 probe 02020-L12922	15q11,2	173	15-021.4 MKRN3	4	Gain (1,4)	Normal (1,07)
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11,2	409	15-021.4 MAGEL2	5	Gain (1,34)	Normal (0,93)
NDN probe 11149-L11833	15q11,2	445	15-021.5 NDN	6	Ambiguous (1,19)	Normal (1,04)
NDN probe 04027-L13937	15q11,2	418	15-021.5 NDN	7	Gain (1,79)	Normal (1,07)
SNRPN probe 11178-L11862	15q11,2	286	15-022.9 SNRPN	8	Gain (1,51)	Normal (1,05)
SNRPN probe 12178-L13090	15q11,2	238	15-022.9 SNRPN	9	Gain (1,42)	Normal (1,06)
SNRPN probe 12179-L13383	15q11,2	277	15-022.9 SNRPN	10	Gain (1,57)	Normal (1,15)
SNRPN probe 12182-L13094	15q11,2	271	15-022.9 SNRPN	11	Gain (1,59)	Normal (1)
SNRPN probe 02027-L12881	15q11,2	257	15-022.9 SNRPN	12	Gain (1,4)	Normal (0,96)
SNRPN probe 12477-L13519	15q11,2	391	15-022.9 SNRPN	13	Gain (1,4)	Normal (1)
SNRPN probe 11181-L11865	15q11,2	250	15-022.9 SNRPN	14	Gain (1,42)	Normal (0,95)
SNRPN probe 04106-L13905	15q11,2	178	15-022.9 SNRPN	15	Gain (1,59)	Normal (1,12)
SNRPN probe 04104-L04294	15q11,2	190	15-022.9 SNRPN	16	Gain (1,7)	Normal (1,05)
SNRPN probe 04103-L02951	15q11,2	142	15-022.9 SNRPN	17	Gain (1,6)	Normal (1,17)
SNRPN probe 01318-L13088	15q11,2	295	15-022.9 SNRPN	18	Gain (1,57)	Normal (1,06)
SNRPN probe 11177-L11861	15q11,2	400	15-022.9 SNRPN	19	Gain (1,45)	Normal (1,03)
SNRPN probe 12719-L13907	15q11,2	214	15-022.9 SNRPN	20	Gain (1,4)	Normal (1,01)
SNRPN probe 12721-L13796	15q11,2	470	15-022.9 SNRPN	21	Gain (1,36)	Normal (0,93)
SNRPN probe 12723-L13798	15q11,2	328	15-022.9 SNRPN	22	Gain (1,42)	Normal (1,02)
UBE3A probe 02034-L12925	15q11,2	356	15-023.2 UBE3A Exon 13	23	Gain (1,46)	Normal (1,01)
UBE3A probe 12082-L13474	15q11,2	301	15-023.2 UBE3A Exon 08	24	Gain (1,58)	Normal (1,17)
UBE3A probe 04620-L00863	15q11,2	160	15-023.2 UBE3A Exon 07	25	Ambiguous (1,31)	Normal (1,13)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11,2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	26	Gain (1,5)	Normal (1,23)
UBE3A probe 10878-L11548	15q11,2	373	15-023.2 UBE3A Exon 05	27	Gain (1,4)	Normal (1,1)
UBE3A probe 04641-L04293	15q11,2	184	15-023.2 UBE3A Exon 01	28	Gain (1,83)	Normal (0,96)
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	364	15-023.6 ATP10A	29	Gain (1,42)	Normal (0,98)
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023.6 ATP10A	30	Ambiguous (1,34)	Normal (0,91)
GABRB3 probe 01316-L09339	15q12	220	15-024.5 GABRB3	32	Gain (1,45)	Normal (1,06)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3	33	Gain (1,44)	Normal (1,12)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13,1	202	15-027.1 APBA2	34	Normal (0,9)	Normal (0,92)
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	35	Normal (1,22)	Normal (0,99)
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	36	Normal (1,01)	Normal (1,07)
Reference probe 08051-L07832	05p15	244	c	37	Normal (1,11)	Normal (1,16)
Reference probe 09533-L09943	07q21	262	c	38	Normal (1,03)	Normal (1)
Reference probe 09824-L10234	10q26	136	c	39	Normal (0,97)	Normal (0,88)
Reference probe 08947-L09042	11p15	454	c	40	Normal (0,94)	Normal (0,96)
Reference probe 03896-L00020	11q23	130	c	41	Normal (1,1)	Normal (1)
Reference probe 08018-L07799	11q24	319	c	42	Normal (1,1)	Normal (1,1)
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	43	Normal (0,93)	Normal (1,08)
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	44	Normal (1)	Normal (1,08)
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	45	Normal (1,05)	Normal (1)
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	46	Normal (1,15)	Normal (1,19)
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	47	Normal (0,9)	Normal (0,93)
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	48	Normal (0,97)	Normal (1)
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	49	Normal (0,98)	Normal (0,97)

Caso 7

A análise cromossômica das metafases com bandas GTG, obtidas a partir da cultura de linfócitos sanguíneos, do paciente 7, uma criança autista do sexo masculino, com 5 anos de idade, revelou um cariótipo normal (Figura 31). Quando analisado por FISH, também não revelou qualquer tipo de alteração cromossômica na região crítica das síndromes de PWS e AS [46,XY.ish 15q11.2(SNRPN, UBE3A)X2)], (Figura 32).

No entanto, a caracterização deste caso por MS-MLPA, veio mostrar que esta criança apresentava uma microduplicação, não da região crítica para as síndromes de PWS e AS, mas localizada na região entre os pontos de quebra BP1 e BP2, envolvendo os *loci* TUBGCP5 e NIPA1 [46,XY mlpA 15(q11-q13)(TUBGCP5++, NIPA1++)], (Tabela IX).

Para esclarecimento do significado desta alteração no fenótipo da criança e identificação da sua origem, efectuou-se o mesmo estudo nos pais, que não apresentavam qualquer tipo de alteração fenotípica. Deste modo, foi possível identificar a mesma alteração na mãe deste paciente (Tabela IX).

Trata-se, assim, de uma duplicação de origem materna que provavelmente, não tem qualquer implicação no quadro clínico desta criança.

Uma vez que a mãe deste paciente se encontrava grávida, foi feito o diagnóstico pré-natal ao seu feto, utilizando o mesmo *kit* de MLPA, de modo a realizar o rastreio de alterações na região 15q11-q13. A técnica de MS-MLPA não encontrou qualquer tipo de alterações nesta região (Tabela X).

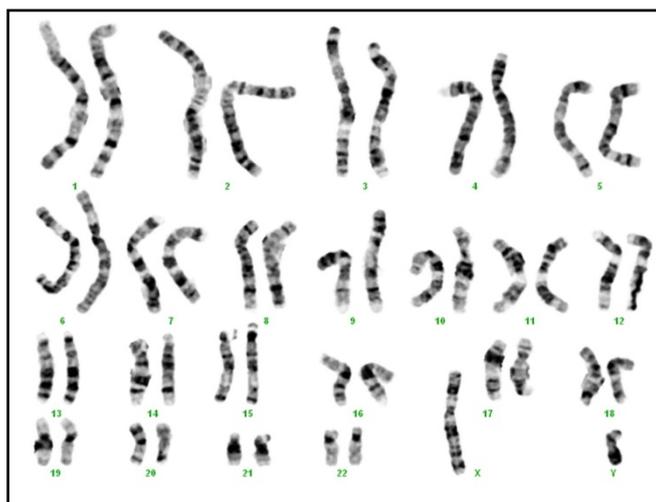


Figura 31: Caso 7: Cariótipo com bandas GTG, sem alterações estruturais na região proximal dos cromossomas 15.

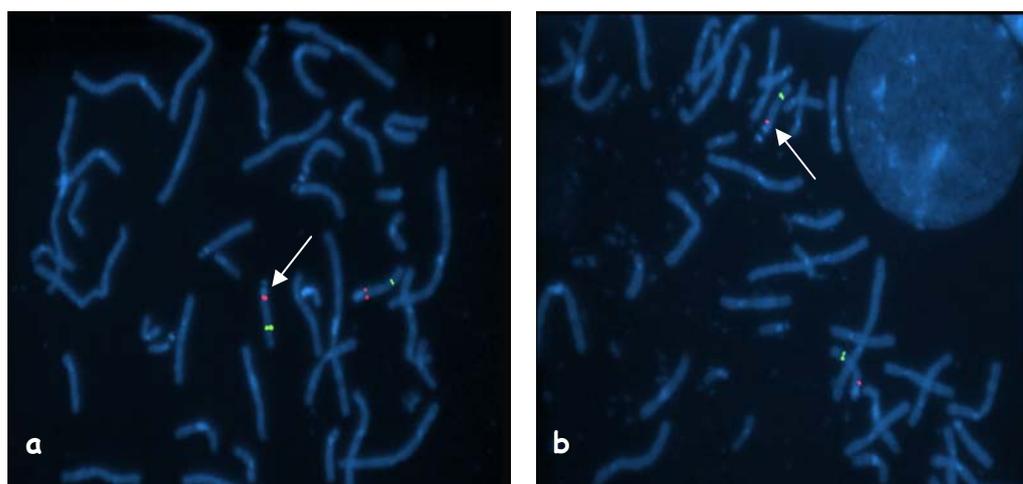


Figura 32: Caso 7: FISH em metafase com as sondas **a)** UBE3A (região crítica a vermelho; região controlo a verde) e **b)** SNRPN (região crítica a vermelho; região controlo a verde), para a região 15q11.2, do paciente 7, sem qualquer alteração para esta região. A seta indica a hibridização com as sondas.

Tabela IX: Resultados de MLPA, utilizando o *kit SALSA ME028* do paciente 7 (a) e da sua mãe (b), em que as sondas para os *loci* TUBGCP5 e NIPAI estão duplicados.

Gene	Chr_pos	Length (nt)	MV36	Ratio	
				a)	b)
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	Normal (1,03)	Normal (1,04)
NIPAI probe 06249-L05755	15q11,2	433	15-020,6 NIPAI 1	Gain (1,45)	Gain (1,44)
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11,2	154	15-020,4 TUBGCP5	Gain (1,42)	Gain (1,46)
MKRN3 probe 02020-L12922	15q11,2	173	15-021,4 MKRN3	Normal (0,94)	Normal (0,97)
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11,2	409	15-021,4 MAGEL2	Normal (0,98)	Normal (1,01)
NDN probe 11149-L11833	15q11,2	445	15-021,5 NDN	Normal (1,02)	Normal (1,02)
NDN probe 04027-L13937	15q11,2	418	15-021,5 NDN	Normal (0,98)	Normal (1,13)
SNRPN probe 11178-L11862	15q11,2	286	15-022,9 SNRPN	Normal (1)	Normal (0,94)
SNRPN probe 12178-L13090	15q11,2	238	15-022,9 SNRPN	Normal (1,07)	Normal (1,08)
SNRPN probe 12179-L13383	15q11,2	277	15-022,9 SNRPN	Normal (0,86)	Normal (0,98)
SNRPN probe 12182-L13094	15q11,2	271	15-022,9 SNRPN	Normal (0,9)	Normal (0,96)
SNRPN probe 02027-L12881	15q11,2	257	15-022,9 SNRPN	Normal (0,92)	Normal (0,98)
SNRPN probe 12477-L13519	15q11,2	391	15-022,9 SNRPN	Normal (1)	Normal (1,03)
SNRPN probe 11181-L11865	15q11,2	250	15-022,9 SNRPN	Normal (1,03)	Normal (1,02)
SNRPN probe 04106-L13905	15q11,2	176	15-022,9 SNRPN	Normal (0,93)	Normal (1,01)
SNRPN probe 04104-L04294	15q11,2	190	15-022,9 SNRPN	Normal (0,89)	Normal (1)
SNRPN probe 04103-L02951	15q11,2	142	15-022,9 SNRPN	Normal (0,87)	Normal (0,89)
SNRPN probe 01318-L13088	15q11,2	295	15-022,9 SNRPN	Normal (0,88)	Normal (1,01)
SNRPN probe 11177-L11861	15q11,2	400	15-022,9 SNRPN	Normal (1,02)	Normal (1,1)
SNRPN probe 12719-L13907	15q11,2	214	15-022,9 SNRPN	Normal (1,19)	Normal (1,14)
SNRPN probe 12721-L13796	15q11,2	470	15-022,9 SNRPN	Normal (1,04)	Normal (1,02)
SNRPN probe 12723-L13798	15q11,2	328	15-022,9 SNRPN	Normal (1,03)	Normal (0,96)
UBE3A probe 02034-L12925	15q11,2	356	15-023,2 UBE3A Exon 13	Normal (1,03)	Normal (1,07)
UBE3A probe 12082-L13474	15q11,2	301	15-023,2 UBE3A Exon 08	Normal (0,94)	Normal (1,11)
UBE3A probe 04620-L00863	15q11,2	160	15-023,2 UBE3A Exon 07	Normal (1,07)	Normal (1,01)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11,2	196	15-023,2 UBE3A Exon 06	Normal (1,06)	Normal (1,04)
UBE3A probe 10878-L11548	15q11,2	373	15-023,2 UBE3A Exon 05	Normal (1,04)	Normal (1,04)
UBE3A probe 04641-L04293	15q11,2	184	15-023,2 UBE3A Exon 01	Normal (1,05)	Normal (1,14)
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	364	15-023,6 ATP10A	Normal (0,97)	Normal (0,96)
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023,6 ATP10A	Normal (1)	Normal (0,9)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	15-024,5 GABRB3	Normal (1)	Normal (0,98)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024,5 GABRB3	Normal (1,05)	Normal (1,1)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13,1	202	15-027,1 APBA2	Normal (0,9)	Normal (0,91)
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	Normal (0,79)	Normal (1,03)
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	Normal (1,01)	Normal (1,1)
Reference probe 08051-L07832	05p15	244	c	Normal (1,09)	Normal (1,17)
Reference probe 09533-L09943	07q21	262	c	Normal (1,1)	Normal (1,06)
Reference probe 08824-L10234	10q26	136	c	Normal (1,14)	Normal (1)
Reference probe 08947-L09042	11p15	454	c	Normal (0,99)	Normal (0,96)
Reference probe 03896-L00020	11q13	130	c	Normal (0,89)	Normal (0,85)
Reference probe 08018-L07799	11q24	319	c	Normal (0,89)	Normal (1)
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	Normal (0,93)	Normal (1,04)
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	Normal (0,98)	Normal (1)
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	Normal (1,01)	Normal (0,98)
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	Normal (1,05)	Normal (1,22)
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	Normal (1,04)	Normal (0,9)
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	Normal (0,95)	Normal (1,03)
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	Normal (0,91)	Normal (0,94)

Tabela X: Resultados de MLPA do feto da mãe do paciente 7, (linhas A e B), utilizando o kit SALSA ME028, em que todas as sondas apresentam um padrão normal.

Linha A Linha B

Gene	Chr_pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio	Ratio
Digestion control 02260-L01747	03p22	463	03-Digestion Control	1	Normal (0.77)	Normal (0.9)
NIPA1 probe 06249-L05755	15q11.2	433	15-020.6 NIPA1	2	Normal (0.82)	Normal (0.9)
TUBGCP5 probe 02018-L00865	15q11.2	154	15-020.4 TUBGCP5	3	Normal (0.95)	Normal (0.99)
MKRNS3 probe 02020-L12922	15q11.2	173	15-021.4 MKRNS3	4	Normal (1.05)	Normal (0.89)
MAGEL2 probe 11155-L11839	15q11.2	409	15-021.4 MAGEL2	5	Normal (0.92)	Normal (0.96)
NDN probe 11149-L11833	15q11.2	445	15-021.5 NDN	6	Normal (0.94)	Normal (1.12)
NDN probe 04027-L13937	15q11.2	418	15-021.5 NDN	7	Normal (1.11)	Normal (1.19)
SNRPN probe 11176-L11862	15q11.2	286	15-022.9 SNRPN	8	Normal (0.98)	Normal (0.95)
SNRPN probe 12178-L13090	15q11.2	238	15-022.9 SNRPN	9	Normal (1.06)	Normal (0.98)
SNRPN probe 12179-L13383	15q11.2	277	15-022.9 SNRPN	10	Normal (1.01)	Normal (0.99)
SNRPN probe 12182-L13094	15q11.2	271	15-022.9 SNRPN	11	Normal (1.05)	Normal (1)
SNRPN probe 02027-L12881	15q11.2	257	15-022.9 SNRPN	12	Normal (1.03)	Normal (1.01)
SNRPN probe 12477-L13519	15q11.2	391	15-022.9 SNRPN	13	Normal (0.88)	Normal (0.98)
SNRPN probe 11181-L11865	15q11.2	250	15-022.9 SNRPN	14	Normal (0.85)	Normal (0.84)
SNRPN probe 04106-L13905	15q11.2	178	15-022.9 SNRPN	15	Normal (1.05)	Normal (0.98)
SNRPN probe 04104-L04294	15q11.2	190	15-022.9 SNRPN	16	Normal (1.08)	Normal (0.97)
SNRPN probe 04103-L02951	15q11.2	142	15-022.9 SNRPN	17	Normal (1.02)	Normal (1.02)
SNRPN probe 01318-L13088	15q11.2	295	15-022.9 SNRPN	18	Normal (1.04)	Normal (0.98)
SNRPN probe 11177-L11861	15q11.2	400	15-022.9 SNRPN	19	Normal (0.93)	Normal (1.03)
SNRPN probe 12719-L13907	15q11.2	214	15-022.9 SNRPN	20	Normal (0.88)	Normal (0.94)
SNRPN probe 12721-L13796	15q11.2	470	15-022.9 SNRPN	21	Normal (0.83)	Normal (0.95)
SNRPN probe 12723-L13798	15q11.2	328	15-022.9 SNRPN	22	Normal (0.91)	Normal (0.94)
UBE3A probe 02034-L12925	15q11.2	356	15-023.2 UBE3A Exon 13	23	Normal (0.95)	Normal (0.96)
UBE3A probe 12082-L13474	15q11.2	301	15-023.2 UBE3A Exon 08	24	Normal (0.93)	Normal (0.92)
UBE3A probe 04620-L00863	15q11.2	160	15-023.2 UBE3A Exon 07	25	Normal (1.16)	Normal (1.07)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	196	15-023.2 UBE3A Exon 06	26	Normal (0.83)	Normal (0.97)
UBE3A probe 10878-L11548	15q11.2	373	15-023.2 UBE3A Exon 06	27	Normal (0.89)	Normal (0.94)
UBE3A probe 04641-L04293	15q11.2	184	15-023.2 UBE3A Exon 01	28	Normal (0.96)	Normal (0.87)
ATP10A probe 11162-L11846	15q12	364	15-023.6 ATP10A	29	Normal (0.97)	Normal (1.02)
ATP10A probe 11159-L11843	15q12	226	15-023.6 ATP10A	30	Normal (1.17)	Normal (1.16)
GABRB3 probe 01315-L08339	15q12	220	15-024.5 GABRB3	32	Normal (1.01)	Normal (0.95)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	15-024.5 GABRB3	33	Normal (0.85)	Normal (0.89)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	15-027.1 APBA2	34	Normal (1.05)	Normal (1.03)
Digestion control 01709-L12924	15q26	348	15-Digestion Control	35	Normal (0.86)	Normal (0.93)
Reference probe 05330-L04717	01p21	427	c	36	Normal (0.83)	Normal (1)
Reference probe 08051-L07832	05p15	244	c	37	Normal (0.96)	Normal (0.94)
Reference probe 09533-L09943	07q21	282	c	38	Normal (0.91)	Normal (0.98)
Reference probe 09824-L10234	10q26	136	c	39	Normal (0.85)	Normal (0.9)
Reference probe 08947-L09042	11p15	454	c	40	Normal (0.88)	Normal (0.99)
Reference probe 08896-L00020	11q13	130	c	41	Normal (1.03)	Normal (1.06)
Reference probe 08018-L07799	11q24	319	c	42	Normal (1.03)	Normal (1.04)
Reference probe 08020-L07801	11q24	166	c	43	Normal (1.02)	Normal (1)
Reference probe 07404-L07051	12q13	208	c	44	Normal (1.04)	Normal (1)
Reference probe 01590-L01162	13q14	337	c	45	Normal (1.02)	Normal (1.02)
Reference probe 08372-L08226	17q12	148	c	46	Normal (0.95)	Normal (0.98)
Reference probe 08335-L08267	17q21	232	c	47	Normal (1.18)	Normal (1.08)
Reference probe 08586-L13087	17q23	477	c	48	Normal (0.98)	Normal (0.98)
Reference probe 01576-L01148	22q12	310	c	49	Normal (1.09)	Normal (1.09)

5- Discussão

5- Discussão

O espectro autista trata-se de uma síndrome comportamental complexa, caracterizando-se por dificuldades de interação social e de comunicação, assim como comportamentos repetitivos e estereotipados, (Andres, 2002; Reddy, 2005; Silva, *et al.*, 2002).

A etiologia do autismo é ainda desconhecida, não se sabendo quais os genes associados, todavia, pensa-se que factores genéticos, assim como ambientais sejam a causa do aparecimento desta doença. O facto da etiologia desta doença ser ainda desconhecida é provavelmente devido à sua heterogeneidade fenotípica e genética (Wassink *et al.*, 2004). No entanto, parecem existir determinadas regiões cromossómicas mais susceptíveis, como por exemplo a 15q11-q13, (Andres, 2002), em que 1% a 4% das crianças que têm autismo apresentam anomalias citogenéticas nesta região (Keller, 2003; Ouldim, *et al.*, 2007). Uma vez que o autismo é uma doença que envolve múltiplos genes, parece de extrema importância o conhecimento do local exacto onde ocorrem os pontos de quebra das alterações citogenéticas, de modo a identificar os genes candidatos, cujas alterações poderão contribuir para a patogénese do autismo.

Apesar de vários genes e proteínas estarem envolvidos na etiologia do autismo, muito pouco se sabe sobre as suas funções, ou o seu papel no desenvolvimento cerebral. Na pesquisa de genes envolvidos em doenças complexas, podem ser usados diversos estudos, como a procura de anomalias cromossómicas *de novo*, que possam corresponder a translocações, deleções e duplicações envolvidas na etiologia da doença (Andres, 2002).

Neste trabalho, através das técnicas de FISH e MS-MLPA, foi possível estudar com algum detalhe, a região 15q11-q13 do cromossoma 15, utilizando sondas específicas, sendo o objectivo relacionar o autismo com alterações nesta região, assim como a sua frequência na etiologia desta doença.

Dos 429 casos analisados pela FISH, 134 também foram estudados por MS-MLPA, tendo sido diagnosticadas sete anomalias cromossómicas, correspondendo a uma incidência de 1,6%.

O rearranjo cromossómico mais comum que causa ganhos desta região é a presença de cromossomas marcadores supranumerários, também conhecidos como isodicêntricos [idic(15)], ou inversões e duplicações do cromossoma 15 [inv dup(15)].

Os *idic(15)* que não incluem a região crítica para as síndromes de PWS e AS não têm efeitos clínicos, enquanto que aquelas que incluem esta região levam a um fenótipo neurocomportamental. Este tipo de rearranjos é quase sempre de origem materna, e surgem *de novo*. Estes costumam resultar em tetrasomias da região 15q11-q13, sendo, geralmente observadas em pacientes com fenótipos mais severos, como atraso mental, atraso no desenvolvimento, autismo, dismorfismos e epilepsia (Martin e Ledbetter, 2007; Dykens *et al.*, 2004; Depienne *et al.*, 2009).

A não disjunção parece desempenhar um papel na formação de todos os SMC(15), e como este evento ocorre numa maior frequência em mulheres do que em homens, isto pode explicar a predominância dos SMC(15) de origem materna (Roberts, *et al.*, 2003). Um mecanismo sugerido para a formação dos *inv dup(15)* envolve recombinação entre cromossomas homólogos, fora dos sítios específicos para a recombinação genética, seguida da não disjunção e da inativação do centrómero (Ouldim *et al.*, 2007).

A presença de um cromossoma extra marcador pode alterar a actividade do receptor do GABA, que se traduz em manifestações clínicas típicas, como a altura, a hiperactividade, a agressividade e desordens características do autismo (Battaglia, 2005; Battaglia, 2008; Ouldim, *et al.*, 2007).

O caso 1, analisado por citogenética convencional e FISH, demonstrou tratar-se de uma tetrasomia da região proximal do cromossoma 15 (*pter~> q11.2*), de origem materna. A progenitora desta criança apresenta um ligeiro atraso no desenvolvimento, ao contrário do probando que tem autismo grave, uma deficiência mental grave, problemas de coordenação motora, em que só começou a caminhar aos 3 anos de idade, é não verbal, e sem dismorfismos. Esta diferença de fenótipos entre mãe e filha, deve-se, provavelmente, a um mosaico na mãe, abrangendo outro (s) tecido (s) que não o sanguíneo. Face a estes resultados, é provável que a duplicação seja a causa do autismo na criança.

O anel derivado do cromossoma 15, em mosaico, encontrado no paciente 3, não abrange a região crítica 15q11.2, não hibridizando com as sondas para os *loci* UBE3A e SNRPN, o que pode explicar o fenótipo menos severo desta criança, nomeadamente na coordenação motora, na fala e no atraso mental, quando comparado com o paciente 1, em que as sondas para os *loci* UBE3A e SNRPN estão presentes em duplicado. Quando este caso foi estudado por MS-MLPA com o *kit* ME028, que possui mais sondas para

além da UBE3A e SNRPN, verificou-se que as sondas localizadas logo abaixo do centrômero apresentaram amplificação, com valores correspondentes a uma duplicação, nomeadamente nas sondas TUBGCP5, MKRN3, NDN, e MAGEL2. Foi ainda confirmada a ausência das sondas UBE3A e SNRPN.

A literatura refere que indivíduos que possuem *idic(15)* pequenos com cópias extra dos genes incluídos no intervalo BP1-BP2, mas que não possuem material genómico extra, distal a BP2 são fenotipicamente normais, o que parece sugerir que estes genes não exercem efeitos clinicamente significativos. Contudo, os genes TUBGCP5, CYFIP1, NIPA1 e NIPA2 parecem modular os fenótipos de PWS e AS. Pacientes com a síndrome de *Angelman* que possuem deleções no intervalo entre BP1 e BP2 podem apresentar características autistas e deficiências na fala (Huang *et al.*, 1997; Depienne *et al.*, 2009). Os genes MKRN3, NDN, e MAGEL2 são todos de expressão paterna e pensa-se que estão envolvidos em algumas características clínicas da síndrome de PWS.

Apesar da técnica de MLPA não detectar mosaicismos de baixa expressão, este foi detectado no paciente 3, o mesmo não aconteceu com o mosaicismo encontrado na sua mãe, provavelmente por ser em menor percentagem. A mãe desta criança não apresenta alterações fenotípicas. Deste modo, é provável que este marcador em mosaico, não seja por si só, a causa do autismo neste paciente.

A extensão das duas duplicações intersticiais encontradas por FISH (pacientes 4 e 6) foi confirmada pelas sondas de MS-MLPA. Ambas cobrem a região crítica para as síndromes de PWS e AS, entre os pontos de quebra 2 e 3, com cerca de 3 Mb, tal como tem sido reportado em outros estudos com indivíduos autistas (Pujana *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2006). Duplicações intersticiais que não incluem esta região crítica não têm efeitos clínicos, e são geralmente consideradas variantes normais. Pacientes com duplicações intersticiais para o *locus* de PWS/AS têm fenótipos anormais que incluem atraso no desenvolvimento, problemas de linguagem, vários graus de atraso mental, autismo, dificuldades de coordenação motora e ausência de dismorfismos (Bolton *et al.*, 2001; Depienne *et al.*, 2009). Os quadros clínicos encontrados nos pacientes 4 e 6 são semelhantes aos descritos na literatura. Esta região é sujeita a fenómenos de *imprinting*, e duplicações de origem materna estão associadas às ASD, enquanto que duplicações de origem paterna têm fenótipos normais (Cai *et al.*, 2008). Para os dois casos analisados

neste trabalho, as duplicações encontradas tinham origem *de novo*, o que pode indicar que estas são a causa da doença nestes pacientes.

A predominância de duplicações de origem materna sugere que o evento que leva a que estas ocorram é mais comum durante a meiose feminina (Repetto, 2001). E considerando-se também, que as anomalias cromossômicas da região 15q11-q13 de origem materna parecem ser patogênicas, é provável que os genes maternos presentes nesta região actuem de uma maneira dependente da combinação de genes, sendo o seu número de cópias extremamente importante para o normal desenvolvimento e funcionamento do cérebro (Battaglia, 2005).

As alterações que ocorrem na região 15q11-q13 parecem, a nível citogenético, partilhar os mesmos pontos de quebra, o que sugere a existência de um mecanismo comum para estas anomalias, ou um *hotspot* de recombinação. Assim, é possível que as alterações resultem de um *crossing-over* desigual na meiose e que as deleções e duplicações sejam produtos recíprocos (Repetto, 2001).

A literatura indica que geralmente, a severidade do fenótipo é proporcional ao número de cópias extra. Assim, quanto maior for o número de cópias, mais grave será o fenótipo do paciente. Pacientes com triplicações, apresentam geralmente características clínicas mais severas do que pacientes com duplicações, o que sugere que existe um efeito da combinação dos genes naquela região. É o caso dos pacientes 4 e 6, já referidos, e os pacientes 2 e 5, com duplicações e triplicações respectivamente, na região crítica 15q11.2. Pacientes com triplicações parecem ter problemas de coordenação motora mais graves, começando a andar mais tarde. Deste modo, a expressão genética nesta região crítica é regulada por um mecanismo de *imprinting* genético. (Silva, *et al.*, 2002; Battaglia, 2005).

A literatura refere que as duplicações intersticiais partilham os mesmos pontos de quebra das deleções, enquanto que as triplicações incluem as sequências distais à região crítica para a síndrome de PWS, e partilham os pontos de quebra dos SMC(15) grandes (Roberts *et al.*, 2002).

Triplicações da região 15q11-q13 parecem ser relativamente raras, uma vez que apenas foram reportados na literatura 9 casos (Schinzel *et al.*, 1994; Cassidy *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2002; Ungaro, *et al.*, 2001)

As triplicações encontradas nos pacientes 2 e 5, (Figura 31) ambas *de novo*, abrangem um maior número de genes alterados do que as duplicações. Além dos genes,

MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A, GABRB3 que estão alterados nas duplicações, os genes TUBGCP5, NIPA1 e APBA2 também se encontram sobreexpressos. A diferença entre as duas triplicações, é que a encontrada no paciente 5 abrange uma extensão maior, chegando até ao gene APBA2 (Figura 31), estando localizada entre BP1 e BP4, com cerca de 6,6 Mb, enquanto que a triplicação do paciente 2 não apresenta um número de cópias extra para este gene. A MS-MLPA só permite dizer que esta alteração se estende até ao gene GABRB3, tendo pelo menos, cerca de 3,8 Mb, estando localizada entre os pontos de quebra BP1 e BP3. Talvez por a triplicação do paciente 5 abranger uma maior área, este apresente um fenótipo mais grave, no entanto, não se podem tirar mais conclusões, uma vez que só foram encontrados estes dois casos.

Os inv dup(15) grandes que contêm a região crítica para as síndromes de PWS e AS são muito parecidos às triplicações intersticiais que envolvem a mesma região. Ambas alterações resultam em tetrasomia da região 15q11-q13 (Vialard *et al.*, 2003). O quadro clínico encontrado nos pacientes com triplicação é semelhante ao encontrado em pacientes que apresentam inv dup(15) ou outros SMC(15) que contêm a região crítica para as síndromes de PWS e AS (Long *et al.*, 1998). Em contraste com os cromossomas inv dup(15) grandes, as triplicações parecem ser tanto de origem materna, bem como de origem paterna, o que sugere que estas têm um mecanismo de formação diferente daquele dos inv dup(15) (Vialard *et al.*, 2003).

Este tipo de alterações parece ocorrer quando se dão duas trocas do tipo U na meiose I, entre três cromátídeos: uma troca entre os cromátídeos homólogos no ponto de quebra distal, seguindo-se uma segunda troca no ponto de quebra proximal entre os cromátídeos irmãos, ou entre os cromátídeos homólogos. Este mecanismo pode dar origem a uma triplicação intersticial com uma cópia central invertida, bem como a um cromossoma pequeno inv dup(15), que pode ou não se perder (Figura 33), (Wang *et al.*, 1999; Ungaro, *et al.*, 2001; Vialard *et al.*, 2003). Um outro mecanismo possível propõe que o primeiro passo na formação da triplicação envolve um cromossoma instável inv dup(15) dicêntrico, de origem materna, que resulta de uma troca do tipo U entre os cromossomas homólogos ou os cromátídeos irmãos. Assim, a recombinação entre este cromossoma alterado e o cromossoma normal, seguida da perda do marcador supranumerário dá origem à triplicação (Schinzel *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1998; Ungaro, *et al.*, 2001).

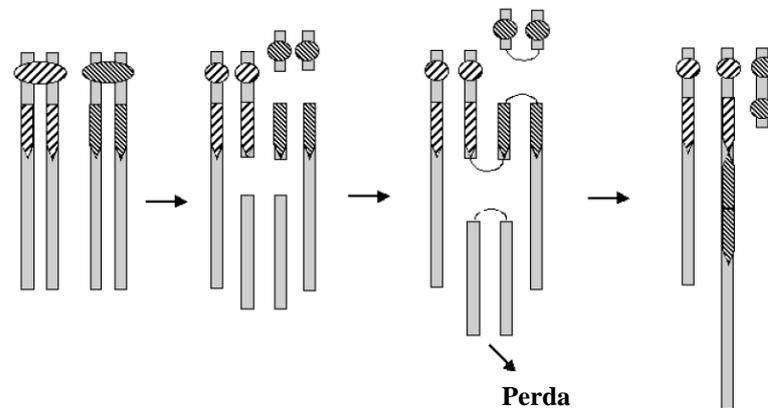


Figura 33: Representação esquemática do mecanismo das triplicações intersticiais 15q11-q13. Este mecanismo envolve uma troca do tipo U entre três cromatídeos: uma troca do tipo U entre os cromatídeos homólogos, no ponto de quebra distal, e a outra troca ocorre no ponto de quebra proximal. Pode envolver os cromatídeos irmãos, aqui representados, bem como os cromatídeos homólogos. O derivativo acêntrico pode perder-se. Cada cópia da região 15q11-q13 é orientada por uma seta, nos cromatídeos (Adaptado de Vialard *et al.*, 2003).

O caso 7 quando analisado por citogenética convencional e FISH não detectou nenhuma alteração cromossômica na região 15q11-q3, no entanto, quando estudado por MS-MLPA demonstrou tratar-se de uma microduplicação da região entre os pontos de quebra BP1 e BP2, com cerca de 254 kb, englobando os genes TUBGCP5 e NIPA1 (Figura 33). Após o estudo dos pais, verificou-se que esta alteração foi herdada da progenitora que não apresenta qualquer tipo de atraso mental. Depienne e seus colaboradores reportaram o caso de dois indivíduos não relacionados entre si, que apresentavam esta mesma duplicação. A literatura refere que ganhos e perdas no número de cópias desta região foram identificados em análises ao genoma, de indivíduos controle, por técnicas de *array*, com uma frequência de 1% na população (Depienne *et al.*, 2009) Tal facto sugere que esta alteração pode tratar-se de um polimorfismo no número de cópias, e assim, esta duplicação de origem materna, provavelmente, não tem qualquer implicação no quadro clínico desta criança.

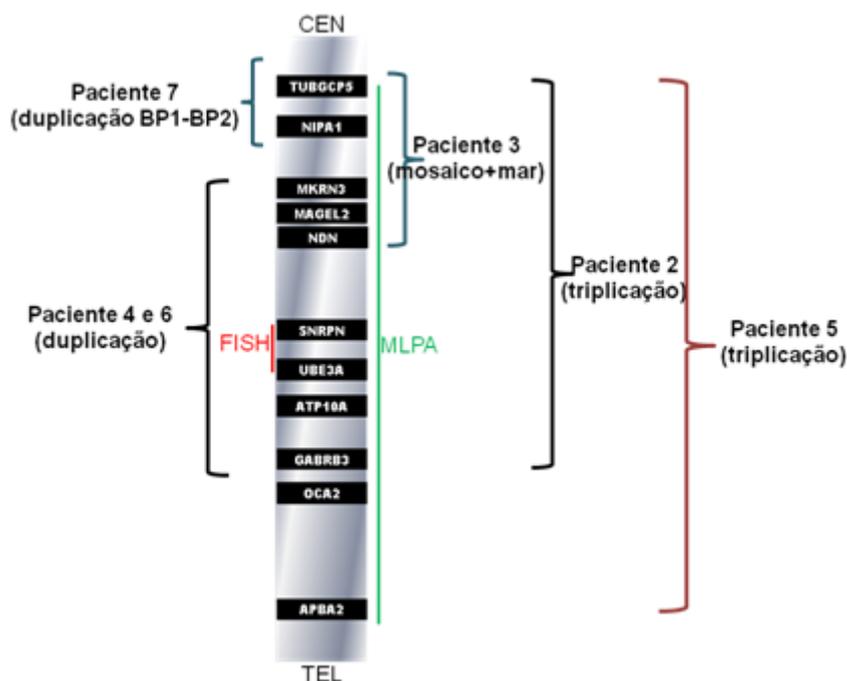


Figura 34: Representação esquemática da região 15q11-q13, com a localização das sondas usadas na FISH e das sondas usadas no MLPA, e com a extensão das alterações cromossômicas encontradas por MLPA.

A variabilidade fenotípica poderá estar relacionada com a origem parental da alteração da região 15q11-q13, uma vez que as duplicações sendo de origem materna, conduzem ao autismo, enquanto as herdadas do pai levam a um fenótipo normal. Duplicações ou triplicações desta região ocorrem em, aproximadamente, 1% das crianças autistas, por transmissão materna (Chen, *et al.*, 2007). Tais estudos parecem demonstrar que o *imprinting* genético desempenha um papel importante na susceptibilidade ao autismo (Silva, *et al.*, 2002). O *imprinting* genético é um fenómeno complexo que modifica a hereditariedade mendeliana. As suas implicações, só recentemente foram reconhecidas, através de estudos de doenças que resultam de anomalias do processo de hereditariedade biparental (Repetto, 2001).

A relação entre as alterações cromossômicas na região em estudo, e o fenótipo dos pacientes não parece ser muito evidente, uma vez que o quadro clínico destes é muito diversificado, o que se deve ao grupo de genes que codificam os receptores dos neurotransmissores, como por exemplo as subunidades do receptor do GABA (Repetto, 2001). Mesmo entre os diferentes grupos de alterações parece ser difícil encontrar uma associação com os fenótipos. A heterogeneidade clínica entre indivíduos com alterações semelhantes sugere que mecanismos genéticos ou epigenéticos influenciam a expressão

genética dos genes presentes nesta região. Alguns estudos que procuraram caracterizar o fenótipo de pacientes com duplicações na região 15q11-q13, encontraram variações entre as pessoas afectadas, tais como, problemas de coordenação motora, dificuldades de concentração e de comunicação, entre outras (Reddy, 2005). Este estudo parece demonstrar que quanto maior o número de cópias extra, maiores são os problemas de coordenação motora.

De acordo com alguns investigadores a epilepsia, dismorfismos faciais e problemas de coordenação motora são algumas das características que definem o designado “fenótipo do cromossoma 15” (Repetto, 2001; Keller *et al.*, 2003).

A literatura descreve uma percentagem de cerca de 1% a 4% de incidência de alterações no cromossoma 15 relacionadas com o autismo, (Keller *et al.*, 2003; Ouldim, *et al.*, 2007). Este estudo demonstrou uma frequência de aproximadamente 1,6%, o que é semelhante àquela reportada em várias publicações. Estes resultados estão de acordo que a FISH é uma técnica extremamente útil e importante na detecção das anomalias cromossómicas na região 15q11-q13. No entanto, trata-se apenas de um resultado parcial, em que são utilizadas poucas sondas para o estudo desta região. É importante o uso de outras metodologias para avaliar casos que não sejam detectados pela FISH ou para clarificação de resultados invulgares ou inconclusivos. No caso do paciente 7, a FISH não foi capaz de detectar a microduplicação localizada na região entre os pontos de quebra BP1 e BP2, uma vez que as sondas utilizadas nesta metodologia não são específicas para os *loci* duplicados (TUBGCP5 e NIPA1).

Uma limitação deste estudo é a falta de critérios clínicos uniformes para a inclusão dos pacientes e a limitada informação do diagnóstico dos pacientes, para permitir um melhor conhecimento sobre o fenótipo, e assim estabelecer uma relação com o genótipo, uma vez que a FISH só utiliza duas sondas, e a maioria dos casos analisados neste estudo foram feitos por esta técnica. É provável que existam alterações que não foram encontradas, devido a limitações da técnica, como por exemplo, a detecção de microdelecções ou microduplicações que não estejam abrangidas pela sequência de DNA da sonda utilizada. Deve-se, assim, iniciar o estudo pelo MLPA de modo a identificar e direccionar os estudos para os genes envolvidos no autismo.

Estudos complementares para a identificação da origem parental parecem, também, ser importantes, visto este factor ser relevante na etiologia do autismo. Estudos moleculares e patológicos complementares de amostras do cérebro humano parecem ser

necessários para avaliar como as cópias extra dos genes presentes na região 15q11-q13 afectam a função neurológica.

O *kit* de MLPA usado neste trabalho, além de detectar as alterações no número de cópias, tem a vantagem de ainda analisar os padrões de metilação nas ilhas de CpG na região 15q11-q13. No entanto, para este trabalho, os padrões de metilação dos pacientes em estudo, não foram ainda analisados, mas de futuro, espera-se que esta análise seja útil no *screening* de alterações epigenéticas que há muito se suspeitam desempenhar um papel no autismo, e deste modo encontrar outros possíveis mecanismos que expliquem esta patologia. Poderá ainda, ser útil na avaliação da origem, *de novo* ou familiar, das alterações encontradas, e assim elucidar sobre a sua contribuição para o fenótipo autista. Se estas alterações no cromossoma 15 não forem por si só a causa do autismo, torna-se de extrema importância procurar novas abordagens e mecanismos que possam explicar esta doença. Este *kit* possui uma grande utilidade na distinção entre as síndromes de PWS e AS, e permitindo distinguir alterações por disomia uniparental, ou nos genes de *imprinting*.

Apesar das diversas vantagens da aplicação da técnica de FISH, o custo elevado desta metodologia, assim como o tempo que é necessário despendido com cada caso, tem despoletado a procura de uma técnica molecular alternativa, mais económica, rápida e igualmente eficaz. Assim, a implementação da técnica de MLPA vem criar expectativas quanto à resolução das limitações da FISH, pois permite, para além das vantagens, já referidas anteriormente, detectar as pequenas alterações cromossómicas que poderão não ser visíveis pela FISH, devido ao maior número de sondas usadas na MLPA, que abrangem uma área maior que as sondas utilizadas na citogenética molecular (FISH), o que foi demonstrado neste trabalho, com o estudo do caso do paciente 3, em que pela análise da MS-MLPA se demonstrou que o marcador encontrado, além de possuir o centrómero possuía também genes da região imediatamente a seguir ao centrómero. Por vezes, a FISH apresenta resultados dúbios e pouco evidentes na interpretação da intensidade e tamanho dos sinais, como o que aconteceu no caso 2, em que a análise pela FISH não permitiu distinguir entre uma duplicação e uma triplicação. Só a análise por MS-MLPA permitiu a resolução deste caso. Na Tabela XI estão resumidos os casos em que se encontraram discrepâncias dos resultados entre as técnicas de FISH e MS-MLPA.

Tabela XI: Resumo dos casos em que foram encontradas discrepâncias de resultados entre as técnicas de FISH e MS-MLPA.

Paciente	FISH	MS-MLPA
2	Duplicação 15q11.2	Triplicação 15q11.2
3	Anel derivado do cromossoma 15; não hibridiza com as sondas para os loci SNRPN e UBE3A.	Amplificação equivalente à região envolvida no anel supranumerário, para as sondas TUBGCP5, MKRN3, NDN, e MAGEL2; ausência das sondas UBE3A e SNRPN.
7	Sem alterações para a região 15q11-q13	Microduplicação da região entre os pontos de quebra BP1 e BP2

A metodologia de MLPA permitiu uma melhor delimitação do tamanho das alterações encontradas. Também apresentou algumas desvantagens, nomeadamente na detecção de mosaicismos de baixa expressão.

Tratando-se de um método mais económico, espera-se poder executar mais estudos em pacientes com autismo, afim de, melhor se caracterizar esta doença.

Em síntese, a técnica de MLPA revela-se menos laboriosa, menos dispendiosa e com capacidade de ser aplicada a um maior número de amostras, quando comparada com a técnica de FISH. Para além disso, pode ser realizada usando o equipamento presente na maioria dos laboratórios de genética clínica. Em contraste com a FISH, a MLPA tem dificuldades em detectar mosaicismos de baixa expressão.

Face ao número de casos com diagnóstico clínico de autismo recebidos neste laboratório, é nossa opinião que a estratégia mais produtiva, tanto em termos de definição da área alterada no doente, como na rapidez, sensibilidade e custo, seria a de iniciar o estudo pela técnica de MLPA e cariótipo. Só em casos muito específicos, ou sendo necessária uma confirmação do diagnóstico é que se deve recorrer à técnica de FISH.

6- Conclusão

6- Conclusão

Este trabalho permitiu concluir que a relação das alterações da região 15q11.2 com o autismo tem algum significado, uma vez, que se obteve uma percentagem de 1,6% de casos de autistas com anomalias cromossômicas do 15, o que está de acordo com o descrito na literatura (Keller, *et al.*, 2003; Ouldim, *et al.*, 2007). Estas alterações em autistas parecem ter uma relevância clínica, tornando a pesquisa desta região um teste de diagnóstico molecular obrigatório, após um estudo citogenético normal, de modo a encontrar respostas acerca desta síndrome multifactorial.

A identificação deste tipo de anomalias cromossômicas pode levar a uma melhor informação de prognóstico, através da comparação com outros casos já descritos na literatura, conduzindo a uma melhor compreensão da constituição genética da região 15q11-q13 e os seus efeitos no fenótipo, e dos mecanismos da sua aparente instabilidade. Com o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam determinar o tamanho exacto da alteração cromossômica e dos genes envolvidos, o conhecimento desta patologia poderá evoluir, e dar resposta a casos em que a etiologia seja desconhecida, permitindo uma utilidade clínica.

Testes tradicionais como a citogenética clássica e a FISH são técnicas dispendiosas que não detectam anomalias cromossômicas inferiores a 5 Mb ou resultantes de disomia uniparental. Métodos de *array*-CGH são igualmente dispendiosos e não são usados para detectar alterações no padrão de metilação. A técnica de MS-MLPA é relativamente simples, rápida, sensível e económica, permitindo a detecção simultânea de alterações no número de cópias e nos padrões de metilação, cobrindo a região do braço longo do cromossoma 15, com sondas específicas para a região 15q11-q13. Esta técnica tornou-se um bom método de *screening* para detectar alterações no cromossoma 15 em pacientes com ASD, permitindo ainda, avaliar a origem *de novo* ou familiar, e desse modo dar respostas sobre a contribuição destas anomalias para o fenótipo autista. No entanto, ainda não dispensa a validação das alterações encontradas por técnicas como a FISH.

Várias descobertas têm demonstrado que nos próximos anos, tecnologias de *micro-array* vão permitir identificar o risco da doença em populações específicas. Neste momento, apenas há evidência de pequenos efeitos ambientais na patogénese das ASD, mas no futuro, conhecimentos sobre a epidemiologia e a neurobiologia das ASD podem

levar à descoberta de interações entre gene e ambiente, o que será uma ferramenta poderosa para a etiologia desta doença.

Com a continuação destes estudos, e o refinamento das técnicas de diagnóstico, espera-se aumentar os dados disponíveis sobre estas alterações que ocorrem em indivíduos autistas, particularmente importantes quando são diagnosticadas precocemente. Será, também importante criar co-relações entre fenótipo e genótipo que possam ajudar a perceber qual a contribuição dos genes e as suas funções em crianças autistas, para numa fase posterior realizarem-se estudos familiares de modo a identificar as possíveis famílias de risco, oferecendo o diagnóstico pré-natal.

7- Referências Bibliográficas

7- Referências Bibliográficas

Abrahams B., Geschwind D. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature* 9: 341-355.

Aldosari N., Wiltshire R., Dutra A., Schrock E., Mclendon R., Friedman H., Bigner D., Binger S. (2002). Comprehensive molecular cytogenetic investigation of chromosomal abnormalities in human medulloblastoma cell lines and xenograft. *Neuro Oncol* 4: 75-85.

Andres C. (2002). Molecular genetics and animal models in autistic disorder. *Brain Res Bull* Vol 57, No.1: 109-119.

Bartlett C., Gharani N., Millonig J., Brzustowicz L. (2005). Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Dev Neurosci* 23: 221-234.

Barch M., Knutsen T., Spurbeck J. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Third Edition. The association of Genetics Technologists.* Lippincott- Raven Publishers. Philadelphia.

Baron C., Tepper C., Liu S., Davis R., Wang N., Schanen N., Gregg J. (2006). Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin-proteasome pathway processes. *Hum Mol Genet* 15(6): 853-869.

Battaglia A. (2005) The inv dup(15) or idic(15) syndrome: A clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev* 27: 365-369.

Battaglia A. (2008). The inv dup(15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis* 3: 30-36).

Baumen M., Kemper T., (2005). *The neurobiology of Autism.* 2nd edition. The Johns Hopkins University Press.

- Bittel D., Kibiryeveva N., Butler M. (2007). Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Analysis of Subjects with Chromosome 15 Abnormalities. *Genet Test Vol 11, 4: 467-475.*
- Bolton P., Dennis N., Browne C., Thomas N., Veltman M., Thompson R., Jacobs P. (2001). The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic Spectrum disorders. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet 105: 675-685.*
- Browne C., Dennis N., Maher E., Long F., Nicholson J., Sillibourne J., Barber J. (1997) Inherited Interstitial Duplications of Proximal 15q: Genotype-Phenotype Correlations. *Am J Hum Genet v61: 1342-1352.*
- Cai G., Edelman L., Goldsmith J., Cohen N., Nakamine A., Reichert J., Hoffman Ellen., Zurawiecki D., Silverman J., Hollander E., Soorya L., Anagnostou E., Betancur C., Buxbaum J. (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 Med Genomics. 1:50.*
- Casperson T., Farber S., Foley G. Kudynowski J., Modest E., Simonsson E., Wagh V., Zech L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res 49: 219-222.*
- Cassidy S., Conroy J., Becker L., Schwartz S. (1996). Paternal triplication of 15q11-q13 in a hypotonic, developmentally delayed child without Prader-Willi or Angelman syndrome. *Am J Med Genet 62: 206-207.*
- Chen Z., Zou X., Zhang Y., Son X., Huang C., Tang D. (2007). Identification of novel chromosomal abnormalities, *inv(5)(p13q13)* and *t(7;18)(q32;q21)*, associated with autism. *American J Biotech and Biochem 3: 159-162.*

- Christian S., Fantes J., Mewborn S., Huang B., Ledbetter D. (1999). Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet*, vol. 8, No 6: 1025-1037.
- Christian S., Brune C., Sudi J., Kumar R., Liu S., Karamohamed S., Badner J., Matsui S., Conroy J., McQuaid D., Gergel J., Hatchwell E., Gilliam T., Gershon E., Nowark N., Dobyns W., Cook E. (2008). Novel Submicroscopic Chromosomal Abnormalities Detected in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry* 63: 1111-1117.
- Cirigliano V., Voglino G., Marongiu A., Canadas P., Ordoñez E., Lloveras E., Plaja A., Fuster C., Adinolfi M. (2006). Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann NY Acad Sci* 1075: 288-298.
- Conrad B., Bena F., Dahoun-Hadorn S. (2005). Rapid prenatal diagnosis of chromosome abnormalities: from FISH to QF-PCR. *Rev Med Suisse* 16: 785-788.
- Cook E., Courchesne R., Cox N. (1998). Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am J Hum Genet* 62: 1077-1083.
- D'Alton M., Malone F., Chelmow D., Ward B., Bianchi D. (1997). Defining the role of fluorescent in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidias. *Am J Obstet Gynecol* 176: 769-774.
- Dennis N., Veltman M., Thompson R., Craig E., Bolton P., Thomas N. (2006). Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11-q13. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 140A: 434-441.
- Depienne C., Moreno-De-Luca D., Heron D., Bouteiller D., Gennetier A., Delorme R., Chaste P., Siffroi J., Bastaraud S., Benyahia B., Trouillard O., Nygren G., Kopp S., Johansson M., Rastam M., Burglen L., Leguern E., Verloes A., Leboyer M.,

- Brice A., Gillberg C., Betancur C. (2009). Screening for Genomic Rearrangements and Methylation Abnormalities of 15q11-q13 Region in Autism Spectrum Disorders. *Biol Psychiatry* XX:XXX.
- Dudarewicz L., Hozgreve W., Jeziorowska A., Jakubowski L., Zimmermann B. (2005). Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* 46: 207-215.
- Dykens E., Stucliffe J., Levitt P. (2004). Autism and 15q11-q13 Disorders: Behavioral, Genetic, and Pathophysiological Issues. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10: 284-291.
- El Mouatassim S., Becker M., Kuzio S., Ronsin C., Gil S., Nouchy M., Druard L., Forestier F. (2004). Prenatal diagnosis of common aneuploidias using multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther* 19: 496-503.
- Fan Y. (2002) *Molecular cytogenetics. Protocols and applications*. New Jersey: Human Press, ISBN 1-59259-300-3.
- Feldman B., Ebrahim S., Hazan S., Gyi K., Johnson M., Johnson A., Evans M. (2000). Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. *Am J Med Genet* 90: 233-238.
- Ford C., Hamerton J. (1956a). A colchicines, hypotonic citrate, squash sequences for mammalian chromosomes. *Stain Technl* 31(6): 247-251.
- Ford C., Hamerton J. (1956b). The chromosome of man. *Nature* 178 (4541): 1020-1023.
- Gadia C., Tuchman R., Newran R. (2004). Autism and pervasive developmental disorders. *J Pediatr* 80 (2 Supl): S83-S94.
- Gall J., Pardue M. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378-383.

- Gardner R., Sutherland G. (2004). Chromosome abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press, 3^a edição, ISBN 0-19-514960-2.
- Gerdes T., Kirchhoff M., Lind A., Vestergaard L., Schwartz M., Lundsteen C. (2004). Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 13: 171-175.
- Hochstenbach R., Meijer J., van de Burg J., Vosseveld-Hoff I., Jansen R., van der Luijt R., Sinke R., Page-Christiaens G., Ploos van Amstel J., Pater J. (2005). Rapid detection of chromosomal aneuploidias in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn* 25: 1032-1039.
- Hogart A., Wu D., LaSalle J., Schanen N., (2008a). The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis* 4C: 2-12.
- Hogart A., Leung K., Wang N., Wu D., Driscoll J., Vallero R., Schanen C., LaSalle J. (2008b). Chromosome 15q11-13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J Med Genet* 46 (2): 86-93.
- Hsu T. (1952). Mammalian chromosomes in vitro: I. The karyotype of man. *J Hered* 43: 167-172.
- Huang B., Crolla J., Christian S., Wolf-Ledbetter M., Macha M., Papenhausen P. (1997). Refined molecular characterization of the breakpoints in small inv dup(15) chromosomes. *Hum Genet* 99: 11-17.
- Huang B., Bartley J. (2003). Partial Hexasomy of Chromosome 15. *Am J Med Genet* 121A: 277-280.
- 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.

- Kanner L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 2: 217-250
- Kato C., Tochigi M., Ohashi J., Koishi S., Kawakubo Y., Yamamoto K., Matsumoto H., Hashimoto O., Kim S., Watanabe K., Kano Y., Nanba E., Kato N., Sasaki T. (2008). Association Study of the 15q11-q13 Maternal domain Expression in Japanese Autistic Patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1008-1012.
- Keller K., Williams C., Wharton P., Paulk M., Bent-Williams A., Gray B., Ward A., Stalker H., Wallace M., Carter R., Zori R. (2003). Routine Cytogenetic and FISH Studies for 17p11/15q11 Duplications and Subtelomeric Rearrangement Studies in Children with autism Spectrum Disorders. *Am J of Med Genet* 117A: 105-111.
- Klinger K., Landes G., Shook D., Harvey R., Lopez L., Locke P., Lerner T., Osathanondh R., Leverone B., Houseal T. (1992). Rapid detection of chromosome aneuploidias in uncultured amniocytes by using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 51: 55-65.
- Kwasnicka-Crawford D., Roberts W., Scherer S. (2007). Characterization of an Autism-Associated Segmental Maternal Heterodisomy of the Chromosome 15q11-13 Region). *J Autism Dev Disord* 37: 694-702.
- Langerak P., Nygren A., Schouten J., Jacobs H. (2005). Rapid and quantitative detection of homologous and non-homologous recombinant events using three oligonucleotide MLPA. *Nucl Acids Res* 33: e188.
- Long F., Duckett D., Billam L., Williams D., Crolla J. (1998). Triplication of 15q11-q13 with inv dup(15) in a female with developmental delay. *J Med Genet* 35: 425-428.
- Maggouta F., Roberts S., Dennis N., Veltman M., Crolla J. (2003) A supernumerary marker chromosome 15 tetrasomic for the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region in a patient with a severe phenotype. *J Med Genet* 40: 84-88.

- Mann K., Donaghue C., Fox S., Docherty Z., Ogilvie C. (2004). Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 12: 907-915.
- Martin C., Ledbetter D. (2007). Autism and Cytogenetics: Solving Autism One Chromosome at a Time. *Curr Psychiatry Rep* 9: 141-147.
- Muhle R., Trentacoste S., Rapin I. (2004). The genetics of Autism. *Am Acad Pediatr* 113: 472-486.
- Mundle S., Sokolova I. (2004). Clinical implications of advanced molecular cytogenetics in cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 4(1): 71-81.
- Murthy S., Demetrick D. (2006). New approaches to fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 319: 237-259.
- Nicolini U., Lalatta F., Natacci F., Curcio C., Bui T. (2004). The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidias: time for reconsideration. *Hum Reprod* 10: 541-548.
- Nygren A., Ameziane N., Duarte H., Vijzelaar R., Waisfisz Q., Hess C. Schouten J., Errami A. (2005). Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nuclei Acids Res* Vol. 33, N° 14.
- Ogilvie C. (2003). Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol* 51: 156-160.
- Oliveira G., Ataíde A., Marques C., Miguel T., Coutinho A., Vieira L., Gonçalves E., Lopes N., Rodrigues V., Mota H., Vicente A. (2007). Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Dev Med Child Neurol* 49: 726-733.

- Ouldim K., Natiq A., Jonveaux P., Sefiani A. (2007). Tetrasomy 15q11-q13 diagnosed by FISH in a patient with autistic disorder. *J Biomed and Biotech ID 61538*: 1-4.
- Palomares M., Delicado A., Lapunzina P. (2006). MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet 69*: 228-233.
- Pergament E., Chen P., Thangavelu M., Fiddler M. (2000). The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn 20*: 215-220.
- Pertl B., Kopp S., Kroisel P., Häusler M. (1997). Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidias and fetal sex. *Am J Obstet Gynecol 177*: 899-906.
- Procter M., Chou L., Tang W., Jama M., Mao R. (2006). Molecular Diagnosis of Prader-Willi and Angelman Syndromes by Methylation-Specific Melting Analysis and Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Clin Chem 52 (7)*: 1276-1283.
- Pujana M., Nadal M., Guitart M., Armengol L., Gratacos M., Estivill X. (2002). Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet 10(1)*: 26-35.
- Qumsiyeh M., Rafi S., Sarri C., Grigoriadou M., Gyftodimou J., Pandelia E., Laskari H., Petersen M. (2003) Double Supernumerary Isodicentric Chromosomes Derived From 15 Resulting in Partial Hexasomy. *Am J Med Genet 116A*: 356-359.
- Reddy K. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-x syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BCM Medical Genetics 6*:3.
- Repetto G. (2001). Genomic imprinting and human chromosome 15. *Biol Res V 34 n.2*.

- Robertis E., Robertis E. (1987). *Cell and Molecular Biology*. 8th edition.
- Roberts S., Dennis N., Browne C., Willatt L., Woods G., Cross I., Jacobs P., Thomas N. (2002). Characterisation of interstitial duplications and triplications of chromosome 15q11-q13. *Hum Genet* 110: 227-234.
- Roberts S., Maggouta F., Thomas N., Jacobs P., Crolla J. (2003). Molecular and Fluorescence in situ hybridization Characterization of the Breakpoint in 46 Large Supernumerary Marker 15 Chromosomes Reveals an Unexpected Level of Complexity. *Am J Hum Genet* 73: 1061-1072.
- Rooms L., Reyniers E., Luijk R., Scheers S., Wauters J., Ceulmans B., End J., Bever Y., Kooy R. (2004). Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Hum Mutation* 23:17-21. .
- Rudkin G., Stollar D. (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265: 472-473
- Schannen N. (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 15: 138-150.
- Schinzel A., Brecevic L., Bernasconi B., Berthet F., Wuilloud A., Robinson W. (1994). Intrachromosomal triplication of 15q11-q13. *J Med Genet* 31: 798-803.
- Schouten J., McElgunn C., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57.
- Sebat J., Lakshmi B., Malhotra D., Troge J., Martin C., Walsh T., Yamrom B., Yoon S., Krasnitz A., Kendall J., Leotta A., Pai D., Zhang R., Lee Y., Hicks J., Spence S., Lee A., Puura K., Lehtimäki T., Ledbetter D., Gregersen P., Bregman J., Sutcliffe J., Jobanputra V., Chung W., Warburton D., King M., Skuse D.,

- Geschwind D., Gilliam T., Ye K., Wigler M. (2007). Strong Association of The Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science* 316: 445-449.
- Shaffer L., Bejjani B. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod* 10: 221-226.
- Shaffer L., Tommerup N. (2005). *ISCN- Internacional Sistem for Human Cytogenetics Nomenclature*. Karger Publishers Inc Basel. ISBN 3-8055-8019-3.
- Silva A., Vayego-Lourenço A., Fett-conte A., Goloni-Bertollo E., Varella-Garcia M. (2002). Tetrasomy 15q11-q13 identified by Fluorescence in situ hybridization in a patient with autistic disorder. *Arq Neuropsiquiatric* 60 (2-A): 290-294.
- Slater H., Bruno D., Ren H., Pertile M., Schouten J., Choo K. (2003). Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 40: 907-912.
- Smeets D. (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* 37(6): 439-446.
- Speicher M., Carter N. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6(10): 782-792.
- Steyaert J., Marche W. (2008). What's new in autism?. *Eur J Pediatr* 167: 1091-1101.
- Tepperberg J., Pettenani M., Rao P., Lese C., Rita D., Wyandt H., Gersen S., White B., Schoonmaker M. (2001). Prenatal diagnosis using interfase fluorescent in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 21: 293-301.
- Thein A., Abdel-Fattah S., Kyle P., Soothill P. (2000). An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in Prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 20: 275-280.

- Thilaganathan B., Sairam S., Ballard T., Peterson C., Meredith R. (2000). Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolour fluorescent in situ hybridization. *Br J Obstet Gynaecol* 107: 262-266.
- Tijo J., Levan A. (1956) The chromosome number in man. *Hereditas* 42: 1-6.
- Ungaro P., Christian S., Fantes J., Mutirangura A., Black S., Reynolds J., Malcolm S., Dobyns W., Ledbetter D. (2001). Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* 38: 26-34.
- Van Dyke D., Weisse L., Logan M., Pai G. (1977). The origin and behavior of two isodicentric bisatellited chromosomes. *Am J Hum Genet* vol. 29, 3: 294-300.
- van Ommen G., Breuning M., Raap A. (1995). FISH in genome research and molecular diagnostic. *Curr Opin Genet Develop* 5: 304-308.
- Verma R., Babu A. (1995). *Human chromosomes. Principles and techniques*. New York: McGraw-Hill, Inc 2ª edição, ISBN 0-07-113773-4.
- Vialard F., Mignon-Ravix C., Parain D., Depetris D., Portnoi M., Moiro H., Mattei M. (2003). Mechanism of Intrachromosomal Triplications 15q11-q13: A New Clinical Report. *Am J Med Genet* 118A: 229-234.
- Wagner S., Castel M., Gainer H., Yaron Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387: 598-603.
- Wandstrat A., Cox J., Jenkins L., Schwartz S. (1998). Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am J Hum Genet* 62: 925-936.

Wang J., Reddy K., Wang E., Halderman L., Morgan B., Lachman R., Lin H., Cornford M. (1999). Intrachromosomal Triplication of 2q11.2-q21 in a Severely Malformed Infant: Case Report and Review of Triplications and Their Possible Mechanism. *Am J Med Genet* 82: 312-317.

Wassink T., Brzustowicz L., Bartlett C., Szatmari P. (2004). The Search for Autism Disease Genes. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10: 272-283.

Yoon H., Park Y., Kim Y. (2002). Rapid prenatal detection of Down and Edwards syndromes by fluorescent polymerase reaction with short tandem repeat markers. *Yonsei Med J* 43: 557-566.

<http://www.ensembl.org>

<http://www.vysis.com>

<http://www.mlpa.com>

<http://www.softgenetics.com>

<http://www.kreatech.com>

8- Anexos

8- Anexos

8.1- Anexo A

Soluções para FISH

1. Solução SSC 20X (pH=7)

Para 500ml:

44,1g de citrato de sódio

87,65g de cloreto de sódio

2. Solução SSC 2X (pH=7)

50ml de 20x SSC

450ml de água destilada

3. Etanol a 70%

350ml de etanol absoluto

150ml de água destilada

4. Etanol a 85%

425ml de etanol absoluto

75ml de água destilada

5. Solução SSC 2X com *Tween* (pH=7)

50ml de 20x SSC

450ml de água destilada

250µl de *Tween* 20

8.2- Anexo B

Extracção de DNA pelo Kit JETQUICK Blood Midi/Maxi Spin (Genomed)

Para extrair DNA, adicionam-se 3 ml de sangue colhido em EDTA, 300 µl de Proteínase K e 3 ml de tampão K1 e faz-se um vortex durante 5 a 10 segundos. De seguida, incubam-se os tubos de *falcon* num banho-maria, durante 10 minutos a 72°C e adicionam-se 3 ml de etanol absoluto. Transfere-se a amostra para uma coluna do kit que possui uma membrana de sílica com carga positiva, que retém apenas o DNA, e centrifuga-se durante 3 minutos, a 2000 g. Após a centrifugação, descarta-se o líquido e adicionam-se 10 ml de KX (solução de lavagem de elevada salinidade), centrifugando-se os linfócitos durante 2 min, a 5000 g. O líquido é novamente descartado, e adiciona-se nova solução de lavagem, K2, repetindo-se o procedimento anterior. Os linfócitos são centrifugados durante 10 minutos, após se ter descartado o líquido, seguindo-se a adição de 1 ml de tampão de eluição, previamente aquecido num banho-maria a 72°C. As colunas são incubadas à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e por fim, centrifuga-se a amostra, durante 5 minutos, a 5000 g.

Após este procedimento, o sedimento de DNA encontra-se no sobrenadante e pode ser utilizado em reacções de PCR, ou ser armazenado a 4°C ou a -20°C.