

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

Marcella Motta da Costa

Duplicação do gene *MECP2* em meninos com Deficiência Intelectual

Brasília(DF), Fevereiro de 2016

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

Marcella Motta da Costa

Duplicação do gene *MECP2* em meninos com Deficiência Intelectual

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília(DF), Fevereiro de 2016

Marcella Motta da Costa

Duplicação do gene *MECP2* em meninos com Deficiência intelectual

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

Aprovado em 4 de Fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Juliana Forte Mazzeu de Araújo (Presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Pollyanna Almeida Costa dos Santos

Universidade de Brasília (UnB)

Rosângela Vieira de Andrade

Universidade Católica de Brasília (UCB)

Aline Pic-Taylor (Suplente)

Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTOS

Impossível andar por esses longos 2 anos de mestrado sem ter maravilhosas pessoas ao seu redor te apoiando e te mostrando sempre o melhor caminho. Dessa forma, agora ao final de mais essa etapa, se faz imprescindível os agradecimentos por todo o carinho recebido:

Agradeço primeiramente e com toda grandeza a minha ilustre orientadora, Juliana Forte Mazzeu, por toda sua paciência, por tantos ensinamentos ao longo destes 2 anos de jornada, mas principalmente por ter me mostrado que a melhor forma de ensinar alguém é sendo companheira e paciente. A humildade com que sempre estive ao meu lado é o que me faz lhe dedicar tamanha admiração.

Agradeço também, pelo grande exemplo a seguir, a professora Nazaré Klautau. O meu muito obrigada por tantos conselhos e puxões de orelha que me trouxeram como uma pessoa aqui onde estou hoje. Seus conselhos com certeza serão levados sempre comigo.

Agradeço às professoras Aline Pic-Taylor e a professora Silviene Fabiana de Oliveira pela oportunidade de me inserir no laboratório, pelo grande auxílio sempre direcionado a mim, principalmente em me proporcionar boas condições de trabalho, vários esclarecimentos, grandes vivências acadêmicas e bons conselhos.

Agradeço também a todos do Laboratório de Genética da Faculdade de Ciências da Saúde por sempre me darem todo o suporte para desenvolver meu mestrado, mas principalmente pela grande parceria que pude manter com todos vocês: Aluísio, Nilza, Pedro, Dr^a Mara e principalmente à Dr^a Íris.

Agradeço as todos os colegas do Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas IB da UnB pelo apoio e grande ajuda que todos me deram nesses anos. À Rafaela Toledo, Ana Carolina Arcanjo, Mariana Marzullo, Fabíola Turiel, Yasmin Lima, Larissa Nunes, Glauber e Mateus, o meu muito obrigada por tudo!

Inevitável dirigir os meus maiores agradecimentos à minha família que em todos os momentos me deram força para continuar firme e que desde sempre me mostram a cada dia que os melhores exemplos são os que devemos seguir:

À minha mãe, o meu muito obrigada pelos melhores exemplos de superação e integridade. Por, da sua forma, sempre estar ali nos momentos difíceis dessa jornada. Por estar sempre andando ao meu lado.

Ao meu pai meu muito obrigada por tantas/todas palavras de apoio e carinho e por acreditar tanto em mim.

À minha irmã, cunhado e sobrinhos meu grande agradecimento por toda força que me deram nesta jornada. Por cada palavra de incentivo e puxão de orelha que me ajudaram a chegar onde estou hoje. Os dias ficaram mais lindos e tudo mais fácil com os lindos sorrisos dos nossos pequenos Rafael e Gabriel.

À minha querida esposa Isabela por estar sempre de mãos dadas comigo, me dando força para seguir em frente e por acreditar, algumas vezes até mais do que eu mesma, de que eu sou capaz disso tudo e muito mais. Obrigada mais uma vez por trazer sempre o melhor de mim!

E por último, mas nem por isso menos importante, agradeço imensamente aos meus grandes amigos: Juliana Lis, Vanessa Nicolau, Pollyanna Costa, Harumy Sakata, Mariana Marzullo, Sabrina Guimarães e Raphael Bonadio, por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem, cada uma da sua forma, em todos os momentos nessa caminhada. Carrego cada um de vocês comigo sempre! A vocês eu dedico minha eterna gratidão!

“... de nada vale o desgaste da vitória senão a risada e o amor de amigos.”

(Hilaire Belloc)

RESUMO

A Deficiência Intelectual (DI), é um grande problema de saúde pública, visto que sua prevalência é de aproximadamente 2%-3%. Sua maior prevalência em homens se deve ao grande número de formas de DI Ligada ao cromossomo X (DILX). Essa podem ser, classificadas como sindrômicas (S-DILX) ou não-sindrômicas (NS-DILX). Uma das causas mais comuns de DILX em meninos é a duplicação do gene *MECP2*. Estudos anteriores relatam frequências de 1 a 15% de portadores de CNVs incluindo o gene *MECP2* em coortes de meninos com DI. Este trabalho buscou rastrear a presença de microduplicações do gene *MECP2* em uma população de 265 pacientes do sexo masculino, sendo 138 analisados pela técnica de qPCR e 127 pacientes provenientes do banco de dados de análise cromossômica por microarray do laboratório de Genética da UnB. Não foram identificados CNVs do gene *MECP2* nos 265 pacientes estudados. A frequência de CNVs de *MECP2* nesse estudo foi menor que a reportada anteriormente na literatura e sua baixa prevalência não justifica a triagem individual de alterações de número de cópias de *MECP2* em meninos com DI.

Palavras-chave: Síndrome de Duplicação do gene *MECP2*; Deficiência Intelectual (DI); gene *MECP2*.

ABSTRACT

The Intellectual Disability (ID) is a big problem of public health, since its prevalence is approximately 1%. Its higher prevalence in men is due to the large number of forms of ID linked to the X chromosome (DILX). It can be classified as syndromic (S-DILX) or non-syndromic (NS-DILX). One of the most common causes of DILX in boys is the duplication of the *MECP2* gene. Earlier studies reported frequencies from 1 to 15% of CNVs carriers including *MECP2* in cohort of boys with ID. This study aimed to trace the presence of microduplications of the *MECP2* gene in a population of 265 male patients, 138 analysed by qPCR technique and 127 patients from the chromosomal analysis database by microarray from the Genetics Laboratory at UnB. We have not identified none of the *MECP2* gene in 265 patients studied. The frequency of CNVs from *MECP2* in this study was lower than reported previously in the literature and its low prevalence does not justify the individual triage of the alteration of *MECP2* number of copies in boys with ID.

Keywords: gene *MECP2* Duplication Syndrome; Intellectual Disability (ID); *MECP2* gene.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação dos genes relacionados a mutações causadoras de DILX, segundo a classificação do banco de dados do OMIM.....17
- Figura 2.** As barras vermelhas representam as duplicações e as duas outras barras azuis representam deleções dos 30 pacientes analisados por CMA. A sobreposição das duplicações demonstra a região do gene *MECP2* como a duplicação comum entre todos os 30 pacientes.....23
- Figura 3.** Demonstração das regiões transcritas a partir das duas isoformas do gene *MECP2*.....25
- Figura 4.** Plataforma de análise do programa CopyCaller®. Resultados de pacientes sem alterações de número de cópias.....34
- Figura 5.** Análise do gene *MECP2* utilizando a técnica de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA).....36
- Figura 6.** Hibridização das sondas alvo no *GeneChip* (*Affymetrix*, EUA).....37
- Figura 7.** Esquema resumido das etapas realizadas na técnica de CGH-Array (*Affymetrix*, EUA).....42
- Figura 8.** Análise pelo software *ChAS* de um paciente sem alterações patogênicas (*Affymetrix*, EUA).....43
- Figura 9. 9A)** Análises dos resultados da qPCR demonstrando as 11 duplicações encontradas, juntamente com a demonstração dos números de cópias calculadas e os números de cópias preditas. **9B)** Demonstrativo do arredondamento de 1 cópia para 2 cópias nos casos de decimais superiores à 1,5 do Número de Cópias Calculadas.....45

Figura 10. 10A) Análise dos resultados da qPCR com o calibrador de uma mulher possuidora das duas cópias do gene *MECP2* (Controle feminino) originando as 12 duplicações anteriormente encontradas; **10B)** A mudança do resultado para apenas uma duplicação quando utilizado um calibrador masculino.
.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMR	do inglês, American Association on Mental Retardation
AGCC	do inglês, <i>Affymetrix GeneChip® Command Console™</i>
CCN	Número de Cópia Calculado
ChAS	do inglês, <i>Chromosome Analysis Suite</i>
CLS	Solução de Lise Celular
CMA	do inglês, Chromosome Microarray Analysis
CNV	do inglês, <i>Copy Number Variation</i>
Cq	do inglês, <i>Cycle quantitative</i>
DECIPHER	do inglês, <i>Database Of Chromosomal Imbalance And Phenotype In Humans Using Ensembl Resources</i>
DGV	do inglês, <i>Database Of Genomic Variants</i>
DI	Deficiência intelectual
DILX	Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
HDAC	Histonas Desacetilases
HUB	Hospital Universitário de Brasília
Kb	Quilo base (milhares de bases)
Mb	Mega bases (milhões de bases)
MBD	Domínio Metil-citosina de Ligação
MLPA	do inglês, <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>

mRNA	RNA mensageiro
NS-DILX	Deficiência Intelectual Não-Sindrômica Ligada ao X
OCR	do inglês, <i>Oligo Control Reagent</i>
OMIM	do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
QI	Quociente de Inteligência
qPCR	Técnica de PCR em Tempo Real
RefSeq	do inglês, <i>Reference Sequence</i>
RQ	Quociente Relativo
S-DILX	Deficiência Intelectual Sindrômica Ligada ao X
SNC	Sistema Nervoso Central
TdT	do inglês, <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
TRD	Domínio de Repressão de Transcrição
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
VOUS	do inglês, <i>Variants of Unknown Significance</i>
WISC	Wechsler Intelligence Scales for Children

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Deficiência Intelectual	14
1.2 Deficiência Intelectual Ligado ao X	15
1.3 Síndrome de X-Frágil X	18
1.4 Inativação do Cromossomo X	19
1.5 Síndrome de RETT	20
1.6 Mutações do gene <i>MECP2</i> em meninos	21
1.7 Síndrome de Duplicação <i>MECP2</i>	21
1.8 Gene e proteína <i>MECP2</i>	24
1.9 O gene <i>MECP2</i> no desenvolvimento neural	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Principal	29
2.2 Objetivos secundários	29
3. MÉTODOS	30
3.1 Amostras Biológicas	30
3.2 Extração de DNA	31
3.3 PCR quantitativa (qPCR) – Quantificação de CNVs	32
3.4 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)	34
3.5 CMA - Análise cromossômica por microarray	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS	49
ANEXO A - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Deficiência Intelectual

A Deficiência Intelectual (DI), anteriormente tratada como Retardo Mental, está inserida no cenário social há séculos, figurado principalmente como demência e comprometimento do controle comportamental. Esta é uma condição que envolve déficit das habilidades intelectuais, comportamento adaptativo e interação social sendo um grave problema de saúde pública. Um atual modelo conceitual proposto pela *American Association on Mental Retardation* (AAMR) define DI como: *“Limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, como expresso nas habilidades práticas, sociais e conceituais, originando-se antes dos dezoito anos de idade.”* (1).

O diagnóstico da DI requer a observância de três critérios básicos (2):

1º) Início do quadro clínico antes dos 18 anos de idade;

2º) Função intelectual significativamente abaixo da média, demonstrada por um quociente de inteligência (QI) igual ou menor que 70;

3º) Deficiência das habilidades adaptativas em pelo menos duas das seguintes áreas: comunicação, habilidades sociais/interpessoais, autocuidados, rendimento escolar, trabalho, saúde e segurança.

Com a prevalência de aproximadamente 2 a 3% na população mundial, a DI é a razão mais comum de investigação genética e um dos mais importantes problemas de saúde pública. Uma característica relevante é o fato de que sua ocorrência é maior em homens do que em mulheres. A DI é caracterizada quanto à gravidade de acordo com a avaliação pelo teste de Quociente de Inteligência (QI) realizado aos moldes da Wechsler Intelligence Scales for Children (WISC), o qual estipula scores: QI normal quando for >85, DI grave quando o QI <50 e DI leve quando o QI varia entre 50-85.

Supõe-se que as formas leves de DI são provenientes da interação de vários genes e/ou de fatores não genéticos, como o ambiente ou situações fetais específicas. Em contradição, as formas mais graves têm suas causas por motivo de eventos perinatais catastróficos como asfixia fetal e infecções pré-natais ou em maior frequência, as causas genéticas específicas, incluindo as anormalidades cromossômicas e as doenças monogênicas (3).

Dentre os casos de DI estima-se que 2/3 do total são de retardo moderado a grave e apenas 1/3 de casos leves. A DI pode ser dividida em duas categorias de acordo com a presença ou não de sinais dismórficos ou outros sintomas associados sendo assim classificada como sindrômica ou não sindrômica. Nos casos sindrômicos as causas genéticas são mais claras naqueles em que é possível definir uma síndrome genética conhecida ou quando se trata de alteração cromossômica (duplicações ou deleções) (4).

Várias podem ser as causas do fenótipo de DI, sendo elas sindrômica ou não. Entre as causas ambientais temos por exemplo: Infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) neonatal ou pós-neonatal, asfixia perinatal, Síndrome do álcool fetal, encefalopatia hipóxico-isquêmica, entre outras. As principais causas genéticas são ocasionadas por rearranjos cromossômicos, aumento ou diminuições do número de cópias de um gene ou cromossomo (Duplicação ou deleção) e mutações de ponto (SNPs) (5).

1.2 Deficiência Intelectual Ligada ao X

A segunda causa mais comum de DI depois da síndrome de Down é a Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X (DILX) (6). Assim como as demais formas de DI, as ligadas ao X também são classificadas como sindrômicas e não-sindrômicas. A identificação da forma de DI Sindrômica Ligada ao X (S-DILX) está associada a vários outros achados clínicos como por exemplo: dismorfias craniofaciais, alterações cardíacas ou de outros órgãos relacionados, alterações neurológicas, entre outras. Em contraposição, a DI Não-Sindrômica Ligada ao X (NS-

DILX) é muito mais difícil de ser elucidada, visto que, muitas vezes a falta de características clínicas relevantes e específicas, bem como o efeito das várias mutações genéticas distintas não associadas a características sindrômicas, dificulta a comparação de características advindas de famílias não correlacionadas entre si. Nestes casos o diagnóstico mais conclusivo é obtido pela realização de mapas de ligação entre as famílias ou mais precisamente pela detecção da mutação originária da DI por métodos mais precisos (3).

Inúmeras abordagens foram desenvolvidas para auxiliar a identificação de genes e mutações associadas às DILX, entre elas temos: (1) clonagem das posições dos rearranjos cromossômicos ou variantes de número de cópias (CNVs) que afetam o cromossomo X; (2) rastreio de genes localizados em intervalos candidatos identificados por meio de análise de ligação em grandes famílias afetadas por DILX, (3) sequenciamento de genes candidatos com uma função ou padrão de expressão que sugere um papel na cognição ou que se encaixa com as observações clínicas e/ou metabólicas em indivíduos afetados, e (4) sequenciamento de nova geração que permite rastreio de mutações em todas as regiões codificadoras de proteínas do genoma total ou apenas no cromossomo X (7).

Dois terços dos casos de DILX são caracterizados como não-sindrômicos, mas com o avanço tecnológico há um aumento dos casos sindrômicos, visto que com técnicas mais avançadas de investigação das famílias, as síndromes são melhores diagnosticadas ocasionando um maior número de S-DILX. Há também a ocorrência de mutações em um mesmo gene ou até de uma mesma mutação causar DILX sindrômica ou não-sindrômica. Na última atualização do banco de dados dos genes do cromossomo X já relacionados às DIs, acrescentou-se outros genes às formas sindrômicas ligadas ao cromossomo X como visto na Figura 1, sendo que a grande maioria das mutações destes genes acrescentados é de alterações de número de cópias (CNVs) como duplicações ou deleções. (7) (6).

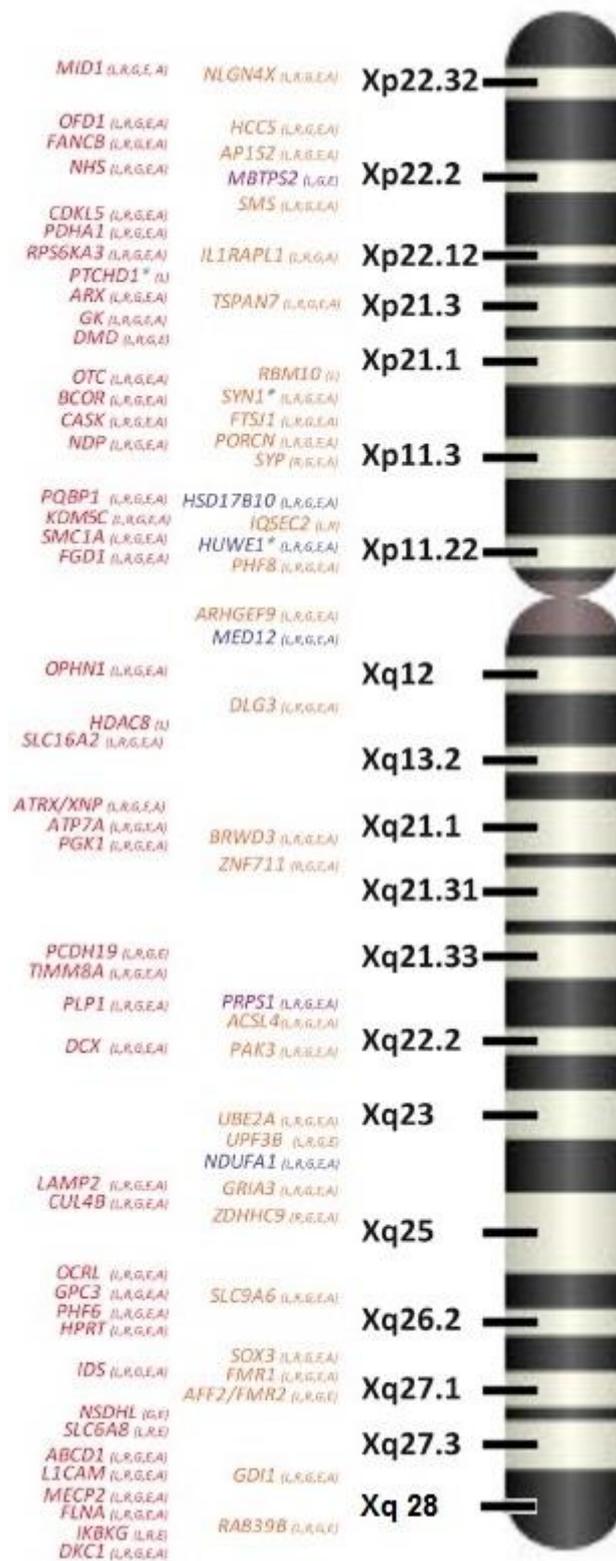


Figura 1. Representação dos genes relacionados à mutações causadoras de DILX ao longo do cromossomo X, segundo a classificação do banco de dados do OMIM (Retirado de Piton *et al.* 2013).

As regiões do cromossomo X com maior número de mutações descritas são: Xp11 e Xq28 e ambas regiões possuem uma enorme quantidade de genes precursores do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), o que torna o cromossomo X alvo para o esclarecimento da origem de muitas causas de DI (3). A observação de que problemas cognitivos são mais comuns em homens do que em mulheres, bem como a descoberta de um importante sítio frágil no cromossomo X de vários homens afetados, foram inicialmente os fatores mais relevantes para o grande interesse no estudo da DI ligada ao cromossomo X. As primeiras especulações a este respeito foram de que aproximadamente 20 a 25% dos casos DIs fossem consequências de mutações no cromossomo X como um todo. Como as mulheres possuem dois cromossomos X, é esperado que o cromossomo X mutado seja preferencialmente inativado compensando o desequilíbrio causado pela mutação (8).

1.3 Síndrome de X-Frágil

Lubs , em 1969, em estudos de um caso familiar de DI observou uma falha (sítio frágil) recorrente na extremidade do braço longo do cromossomo X (9). Em estudos posteriores Richards (1981) reanalisou um caso familiar composto por uma mãe normal com 11 filhos com “retardo mental”, onde foi então confirmado a presença do sítio frágil do cromossomo X afetado e caracterizado o quadro clínico da chamada Síndrome do X-Frágil (10).

Esta síndrome é causada por uma expansão de trinucleotídeos CGG na região 5' não traduzida do gene *FMR1*. Em indivíduos normais a frequência desta repetição é de 5-40 vezes, mas é observado nos indivíduos afetados uma frequência igual ou superior a 200 repetições, ocasionando assim a inativação do gene *FMR1*. A proteína por ele traduzida, *Fragile X mental retardation 1 protein* (FMRP), é encontrada em abundância no Sistema Nervoso, em especial nos neurônios. Uma de suas principais funções é na maturação estrutural e funcional de sinapses trabalhando como um repressor da tradução pós-sináptica (11).

A Síndrome do X Frágil, é a principal causa de DI herdada. Há inúmeros outros genes citados na literatura também frequentemente associados com a DILX, como por exemplo: *RPS6KA3*, *ARX*, *TSPAN7*, *PQBP1*, *OPHN1*, *ACSL4*, *DCX* e o gene *MECP2*, entre outros.

1.4 Inativação do Cromossomo X

A inativação do cromossomo X consiste num processo de inativação de um dos dois cromossomos X que as mulheres possuem, por meio de processos epigenéticos. Este silenciamento ocorre através do aumento de metilação do cromossomo a ser inativado. A inativação de um dos cromossomos X é um evento aleatório, sendo que podem ser inativados tanto o cromossomo de origem paterna, quanto o de origem materna. Este processo ocorre em todas as células no início do desenvolvimento embrionário, tornando assim as mulheres mosaicos, ou seja, possuem as duas linhagens celulares ativas. A inativação de um ou outro cromossomo X, em média, deve ocorrer na mesma proporção, no entanto foi observado que nas mulheres portadoras de mutações deletérias ou patogênicas há uma tendência da inativação do cromossomo X mutado, apresentando assim desvios grandes ou mesmo totais de inativação para compensar os efeitos do alelo mutado (12).

Desvios no padrão de inativação do X podem ser observados em mulheres portadoras de mutações patogênicas nesse cromossomo e foram descritos associados a diversas mutações em genes associados à deficiência intelectual, principalmente nos casos de alterações cromossômicas (13).

1.5 Síndrome de RETT

A síndrome de RETT é caracterizada por uma desordem progressiva no desenvolvimento neurológico manifestada durante a primeira infância de meninas. As pacientes com RETT possuem o desenvolvimento normal até os 18 meses de idade

aproximadamente, e uma boa parte delas iniciam a fala e o desenvolvimento motor normal. A partir de então um importante sintoma do início da degeneração é o retardo no crescimento, que pode levar à microcefalia por volta dos 2 anos de idade (14). Entre as demais características desta síndrome, destaca-se a perda de controle dos movimentos das mãos, hipotonia muscular grave, comportamento irritadiço, perda da fala e algumas características similares ao autismo, como por exemplo: falta de contato visual, hipersensibilidade a sons, indiferença com o meio externo e ausência de expressão facial significativa (15). A maioria das meninas com RETT sofrem anomalias respiratórias, incluindo apneia, perda de respiração e mais progressivamente hiperventilação. Em casos mais graves há também a ocorrência de epilepsia. A grande maioria das meninas perdem a mobilidade, e podem apresentar possíveis complicações cardíacas, incluindo taquicardias e bradicardias (16).

Levando em consideração que a maioria dos pacientes com esta síndrome são meninas, foi postulado uma herança Dominante Ligada ao X, letal em meninos. A síndrome de RETT possui uma incidência de 1/10.000 nascidos vivos do sexo feminino, sendo que 80-90% dos casos são esporádicos. Os casos *de novo* geralmente ocorrem por mutações de ponto na linhagem germinativa paterna (14). O espectro dos tipos de mutações inclui as do tipo *missense*, *nonsense* e mutações *frameshift*, e em alguns casos podem chegar até a uma deleção de éxons inteiros. A gravidade do quadro está diretamente relacionada à proporção de células com o cromossomo X mutado ativo. Como a inativação do X se dá de forma aleatória por isso as pacientes podem ser gravemente afetadas ou serem somente portadoras da mutação (17).

A maioria das mutações *de novo* no gene *MECP2* são originadas a partir da linhagem paterna que envolve uma mutação C/T na ilha CpG adjacente. De uma forma geral as mutações de ponto dos tipos *missense* e *nonsense* são mais comuns, enquanto que as grandes deleções são relativamente raras (cerca de apenas 6%) (18).

1.6 Mutações do gene *MECP2* em meninos

Embora inicialmente a Síndrome de RETT tenha sido considerada letal no sexo masculino, a identificação de meninos afetados pela forma clássica da síndrome quebrou esse paradigma. Foi sugerido que modificadores genéticos poderiam estar suprimindo a letalidade normalmente vista nas perdas de função do gene em meninos (19). Ademais, algumas outras formas de mutações do gene *MECP2* que não causam Rett, como por exemplo as deleções e duplicações são a causa de diversas formas de DI e demais alterações neurológicas em meninos (15).

1.7 Síndrome de Duplicação *MECP2*

A Síndrome de Duplicação do gene *MECP2*, também chamada síndrome de *Lubs* (MIM #300260), é um grave distúrbio do desenvolvimento neurológico, caracterizada por hipotonia infantil, retardo no desenvolvimento psicomotor, grave incapacidade intelectual, desenvolvimento pobre da fala, espasticidade progressiva, infecções respiratórias recorrentes e convulsões (em ~ 50%). A penetrância desta síndrome é de 100% em homens.

Um terço dos homens afetados não são capazes de caminhar de forma independente. Aproximadamente 50% dos homens afetados morrem antes da idade de 25 anos, presumivelmente devido a complicações de infecção recorrente e/ou deterioração neurológica. Observa-se também comportamento autista e disfunção gastrointestinal (20).

Uma importante característica desta duplicação submicroscópica é o fato de serem herdadas de uma mãe portadora, normalmente assintomática (21).

O gene *MECP2* é atualmente um dos principais genes dosagem-sensível que contribui para fenótipos neurológicos diversificados em meninos afetados com Deficiência Intelectual (22).

A síndrome teve sua caracterização inicial em meados de 2004, quando foram identificadas duplicações submicroscópicas em meninos portadores das características clínicas da Síndrome de RETT, porém estes não possuíam as mutações de ponto no gene *MECP2* características desta síndrome. Neste estudo os resultados acabaram sendo inconclusivos, visto que a metodologia usada não conseguiu diferenciar se havia a duplicação completa ou parcial do gene *MECP2* nos meninos (23). Assim se iniciou a investigação e a caracterização de uma síndrome que englobava todos os casos relacionados com a duplicação do Xq28, incluindo o locus *MECP2* (25) (24) (26).

Posteriormente, foi investigado um caso de um menino com quadro clínico de hipotonia, deficiência intelectual e ausência de fala. Neste caso foi encontrada uma duplicação de 430 kb que abrangia todo o locus do gene *MECP2* (27).

Um outro estudo comparou duplicações de diferentes tamanhos de 30 pacientes homens, sendo possível constatar que o gene *MECP2* era a região comum em todos os casos estudados e portanto a região crítica de sobreposição (Figura 2) (28).

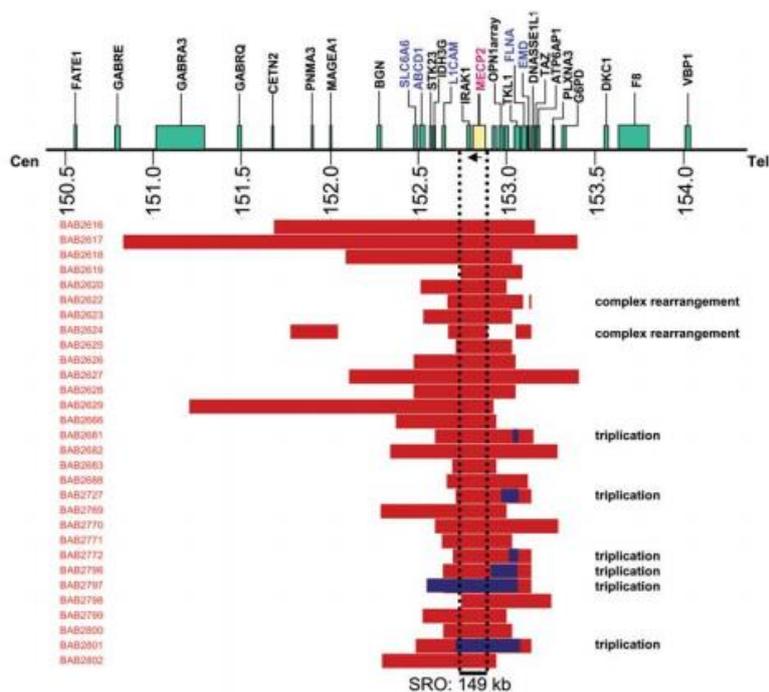


Figura 2. As barras vermelhas representam as duplicações e as duas outras barras azuis representam deleções dos 30 pacientes analisados por CMA. A sobreposição das duplicações demonstram a região do gene *MECP2* como a duplicação mínima comum entre todos os 30 pacientes (28).

A Duplicação do gene *MECP2* é um dos rearranjo cromossômico submicroscópico mais comum relatado na literatura. (29). Um estudo mais recente identificou 2/122 duplicações do *MECP2* em meninos com neuro desenvolvimento atrasado encaminhados para testes de microarray. Quando o público investigado é de meninos com algum tipo de encefalopatia grave a prevalência destes achados é de aproximadamente 3/314. Considerando os homens com Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X, há relatos da duplicação em aproximadamente 3/283 (22).

Van Esche e colaboradores, em 2005, ajudaram a caracterizar esta síndrome quando analisaram uma população de 17 homens com DI e espasticidade progressiva, e destes foram identificados três meninos com a duplicação do gene *MECP2*. Friez e colaboradores, em 2006, também trabalhando nesta linha de raciocínio, investigaram 17 meninos com DI ligada ao X, sendo que neste foram constatadas 2 duplicações (11,8%).

Considerando os dados de artigos anteriores sugere-se que a Síndrome de Duplicação do gene *MECP2* está presente em aproximadamente 1% dos casos de DI ligada ao X (30) (31).

1.8 Gene e proteína *MECP2*

O gene *MECP2* foi inicialmente clonado e mapeado em camundongos e no intervalo entre os genes *L1cam* e o *Rsvp* no cromossomo X (32). Sabendo que esta região é equivalente a região q28 do cromossomo X humano, D'Esposito e colaboradores (1996), utilizaram uma sonda hibridizada e compararam a posição relativa entre o gene humano e o do rato para confirmar a similaridade gênica (33). Posteriormente, Vilain e colaboradores (1996) confirmaram a localização do *MECP2* no braço longo (q) do cromossomo X, na banda 28 (Xq28), com o tamanho de aproximadamente 70 kb entre os genes *L1CAM* e o *Rsvp*. Este gene está sujeito à inativação do cromossomo X, sendo que esta inativação do *MECP2* está geralmente associada à metilação da ilha CPG na sua extremidade 5'. Este gene possui quatro éxons que codificam uma proteína de 485 aminoácidos, rica em aminoácidos básicos e com alto potencial local de fosforilação. Há um compartilhamento de similaridade de sequência total de 93% entre a proteína humana e a de ratos (34).

Em 2004, Mnatzakanian e colaboradores (2004) identificaram uma isoforma até então desconhecida, denominada como *MECP2B*. Esta possui uma posição de iniciação de tradução no éxon 1, pula o éxon 2 e traduz os demais éxons 3 e 4 completos para a formação da proteína de 498 aminoácidos. A isoforma *MECP2A*, denominada como a inicial, traduz sua proteína iniciando no éxon 2 e incluindo os éxons 3 e 4 completamente, formando um produto com 485 aminoácidos. A diferença entre elas ocorre essencialmente no terminal N da proteína. A segunda isoforma possui sua expressão em praticamente todos os tipos teciduais, bem como a primeira, mas sua expressão no sistema nervoso central adulto é aproximadamente 10 vezes maior (Figura 3). Enquanto que a expressão da *MECP2A* é mais abundante na placenta, nos músculos esqueléticos e no fígado (15) (35).

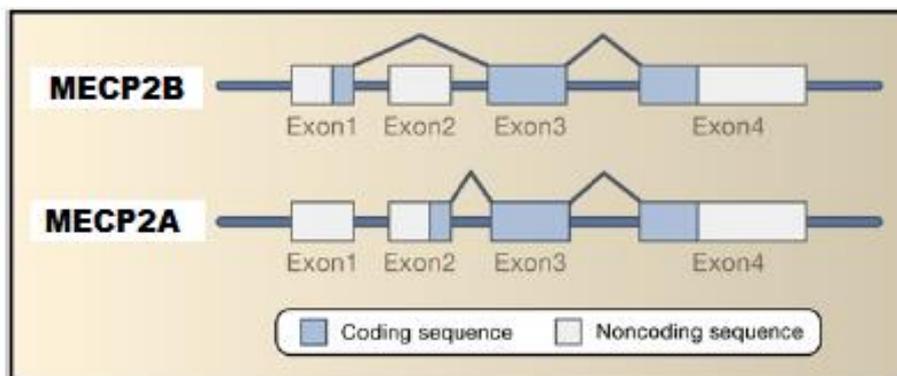


Figura 3. Demonstração das regiões transcritas a partir das duas isoformas do gene *MECP2*, adaptada de (15).

MECP2 é um membro de uma família de proteínas que se liga especificamente a sequências de DNA metilado. A metilação do DNA é uma modificação covalente de dinucleotídeos CpG e uma marca epigenética usada pelas células para alterar a expressão de genes sem alterar permanentemente a sua sequência. Deste modo, a metilação do DNA representa uma modificação genética e epigenética ainda reversível para o genoma (36).

A proteína *MECP2*, originada do gene de mesmo nome, faz parte de uma família de proteínas de domínio metil-CpG-binding (MBD), mas possui diferenças únicas que ajudam a separá-la dos demais do grupo CpG. Ela tem dois domínios funcionais: um domínio metil-citosina de ligação (MBD), composto por 85 aminoácidos, e um domínio de repressão de transcrição (TRD), composto por 104 aminoácidos (26).

As ilhas CpG mostram uma forte seletividade com a ligação do DNA metilado, onde a estrutura do complexo DNA-proteína demonstra a especificidade de ligação entre o grupo metil e citosina, fornecido por vários tipos de contato, mas principalmente mediado por moléculas de água inertes no sulco maior da dupla hélice do DNA. O par de Argininas, das cadeias laterais, também interagem com resíduos do dinucleotídeo CpG-metil. Estas reações demonstram de forma mais contundente a especificidade de ligação 5'-Metil-Citosina no contexto da sequência de DNA (37).

A principal função desta proteína é de repressão transcricional, na qual se liga aos dinucleotídeos CpG metilados agindo como um co-repressor de genes alvos de transcrição (38). O mecanismo de repressão da transcrição envolve um recrutamento de complexos de co-repressores como as histonas desacetilases (HDAC) que são capazes de alterar a estrutura da cromatina do DNA ou bloquear diretamente os fatores de transcrição, sendo esta interação “*MECP2*– cromatina” transitória e dinâmica. A metilação de dinucleotídeos CpG no genoma de mamíferos é essencial para silenciar a transcrição de genes no cromossomo X inativo, bem como a inativação de sequências de transposons endógenos e, possivelmente, age no controle funcional de genes específicos (39). Mais recentemente, foi reconhecido que a proteína *MECP2* requer uma série de quatro ou mais pares de bases de A-T repetitivas adjacentes a metil- CpG para que sua ligação seja eficiente (40).

O RNA mensageiro (mRNA) responsável pela codificação da *MECP2* se apresenta em uma ampla variedade de tecidos no organismo humano, mas os níveis de expressão são cerca de seis vezes maiores no cérebro do que no restante dos tecidos (41). Esta grande expressão da *MECP2* no cérebro, especialmente nos neurônios, está diretamente relacionada com o padrão de maturação das diferentes regiões do cérebro e seus tipos celulares, sugerindo que a proteína desempenhe um papel fundamental na maturação neuronal. Ou seja, esta proteína está intimamente ligada ao bom desempenho fisiológico dos neurônios, visto que é exatamente ela quem controla, através de metilações, as sinapses cerebrais (42). Chahrour e colaboradores, sugeriram que *MECP2* regula a expressão de uma vasta gama de genes no hipotálamo e que ele funciona como um repressor da transcrição. Assim sendo, a *MECP2* pode funcionar como uma chave reguladora da expressão gênica neuronal (43) (44).

1.9 O gene *MECP2* no desenvolvimento neural

A distribuição tecidual desta proteína tem relevância estrutural e funcional no organismo como um todo. A proteína traduzida por este gene desempenha um papel fundamental no início do desenvolvimento pós-natal, e não durante o período embrionário. Tal conclusão foi baseada em estudos do SNC de camundongos, sendo seu estágio gestacional de 21 dias, onde a expressão de *MECP2* foi detectada pela primeira vez na medula espinal e tronco cerebral, em torno do 12º dia do desenvolvimento embrionário, sendo que RNAm foi detectado em regiões subcorticais no começo da fase de neurogênese. O tálamo, o cerebelo, o hipotálamo e o hipocampo se tornam reativos para *MECP2* a partir do 14º dia do desenvolvimento embrionário, bem como a expressão no córtex cerebral. Neste último, a expressão é inicialmente limitada às camadas corticais mais profundas antes do eventual espalhamento para as camadas mais superiores que ocorre aproximadamente por volta do 18º dia de desenvolvimento. E assim é sucessivo o aumento da expressão da proteína no SNC como um todo até a idade adulta, onde está se torna abundante nos neurônios (45). Shahbazian e colaboradores (2001) investigaram as concentrações da proteína MECP2 em vários tipos celulares do SNC e demonstraram que quando analisadas separadamente, as células da glia e as células neuronais, estas últimas possuem um aumento de 2-5 vezes maior em seus núcleos (41). Diante destes fatos, há uma possibilidade aparente de que devido a sua abundância haja uma grande interação com co-repressores agindo através do recrutamento de complexos de Histonas, exceto as H1, pois estas competem com os mesmos sítios de ligação na cromatina, como demonstrado *in vitro*. Tal efeito foi demonstrado em um estudo realizado também por Pearson e col. (2012), onde o gene *MECP2* existente nos núcleos neuronais foi silenciado e a quantidade de histonas H1 se mostrou maior que a da proteína *MECP2* neste caso (46) (47).

Em parâmetros anatômicos, o silenciamento do *MECP2* levou à redução do tamanho do cérebro dos ratos. Isto ocorre devido a diminuição de regiões cerebrais de suma importância, tais como o lobo frontal e temporal, o tálamo, o mesencéfalo e

o cerebelo. Essas alterações correspondem àquelas documentadas em pacientes com Síndrome de RETT. Ao nível celular, a soma de células neuronais é menor em casos de silenciamento do gene (48) (49).

Durante a embriogênese, a proteína *MECP2* se encontra em baixos níveis, mas há um aumento progressivo destes níveis de acordo com o grau de desenvolvimento neuronal pós-natal (50) (51). Além de atuar no desenvolvimento neuronal promovendo a diferenciação das células tronco neurais, concomitantemente, esta proteína reprime a diferenciação dos astrócitos (52).

Curiosamente, a perda ou o aumento do número de cópias do gene *MECP2* causam quadros neurológicos clinicamente semelhantes, no entanto pouco se sabe ainda sobre as consequências biológicas da superexpressão desta proteína no desenvolvimento neurológico (30).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

O objetivo do presente trabalho é rastrear a presença de microduplicações do gene *MECP2* em pacientes do sexo masculino com Deficiência Intelectual.

2.2 Objetivos Secundários

- Triar amostras de meninos com DI para duplicações do gene *MECP2* por PCR em tempo real;
- Validar os resultados da qPCR por meio da técnica de MLPA;
- Verificar a prevalência de duplicações no gene *MECP2* em meninos com DI triados pela análise cromossômica por microarray.

3. MÉTODOS

3.1 Amostras Biológicas

Para esse estudo foram selecionados 265 pacientes do sexo masculino com deficiência intelectual, atendidos no Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília. O primeiro critério para a escolha dos pacientes foi a apresentação de deficiência intelectual leve, moderada ou grave, avaliada com base em suas limitações cognitivas e comportamentais. Tanto em casos síndrômicos como não síndrômicos, selecionamos aqueles que fossem sugestivos de herança ligada ao X ou casos isolados na família. Foram incluídos apenas aqueles que apresentaram cariótipo normal, e que não possuíam a mutação de expansão de trinucleotídeos responsável pela síndrome do cromossomo X frágil. Os responsáveis pelos pacientes preencheram termo de consentimento livre e esclarecido. O presente projeto faz parte do projeto aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 081/2009; 25/11/09).

O número amostral utilizado para a realização da técnica de qPCR foi de 138 pacientes do sexo masculino com quadro de Deficiência Intelectual, sem caracterização de síndrome genética conhecida. Posteriormente, verificamos a prevalência de duplicações do gene *MECP2* no banco de dados de pacientes do Ambulatório de Genética Clínica que realizaram análise cromossômica por microarray no período de 2013 a 2015. Deste banco de dados, 127 pacientes se encaixavam nos requisitos pré-estabelecidos para a montagem do grupo amostral, como citado anteriormente. Somando então os pacientes que foram analisados por qPCR e os demais investigados do banco de dados, totalizamos 265 pacientes investigados quanto às duplicações do gene *MECP2*.

3.2 Extração de DNA

Foi realizada a coleta venosa de sangue periférico em tubo de Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante e posteriormente encaminhado para o Laboratório de Genética Clínica da Universidade de Brasília, onde o DNA foi extraído pelo método Purigene.

Este protocolo é dividido em 4 grandes etapas, sendo elas:

3.2.1 Etapa 1 - Lise Celular

Foram adicionados 4 mL de sangue total em um falcon de 15mL e adicionado mais 9 mL de solução RBC. Para incubação é necessário inverter o tubo ininterruptamente por 10 minutos. Dado os 10 minutos as amostras foram centrifugadas à 3400 rpm por mais 10 minutos. Foi retirado o sobrenadante total, deixando apenas o pellet visível de células brancas e aproximadamente 100-200µl do líquido residual. Para homogeneizar a etapa anterior é necessário vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas. Na etapa de lise celular foi adicionado 3 mL de solução de lise celular (CLS) aos tubos já com as células ressuspendidas e misturado com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea.

3.2.2 Etapa 2 - Precipitação de Proteína

Após a etapa de lise celular foi adicionado 1mL de solução de precipitado de proteína e vortexando vigorosamente por 20 segundos, cada tubo individualmente, para que haja uma mistura uniforme com o lisado celular. Posteriormente os tubos foram centrifugados por mais 10 minutos à 3400 rpm, sendo observado a formação de um pellet marrom escuro e compacto no fundo dos tubos.

3.2.3 Etapa 3 - Precipitação de DNA

Foi feita a transferência do sobrenadante contendo o DNA para um tubo falcon de 15 mL contendo já 3 mL de isopropanol 100%. Foi invertido lentamente até que os “novelos” de DNA aparecessem. Logo após foi centrifugado por mais 3 minutos também à 3400 rpm, retirado o sobrenadante e drenado o tubo em papel absorvente. Depois foram adicionados 3 mL de etanol 70% e invertido várias vezes o tubo. Centrifugou se por 1 minuto o tubo e foi desprezado novamente o sobrenadante cuidadosamente e o tubo ficou invertido em papel absorvente por aproximadamente 15 minutos para secagem.

3.2.4 Etapa 4 - Hidratação do DNA

Nesta fase de hidratação foi adicionado 200-250 µl de solução tampão de TE e deixado a temperatura ambiente por 48 horas para hidratar. Posteriormente todas as amostras foram guardadas no freezer.

3.3 PCR quantitativa (qPCR) – Quantificação de CNVs

Para quantificar os CNVs de interesse foi utilizado o ensaio customizado TaqMan Hs02552272_cn (Applied Biosystems, EUA) para a região específica do gene *MECP2*. Um outro gene comumente descrito como RNaseP, localizado no cromossomo 14q11.2 que é conhecido por apresentar originalmente duas cópias num organismo diploide, foi utilizado como controle positivo interno para calcular o número de cópias do gene de interesse, bem como para confirmar o êxito da amplificação da reação de PCR. Neste primeiro ensaio utilizado foi constatado um problema de concorrência entre as sondas do gene *MECP2* e a sonda do gene RNaseP. Por este motivo, um outro ensaio TaqMan HS01849214_cn foi escolhido para refazer as amostras já feitas e continuar a fazer as demais amostras do experimento. É importante ressaltar que mesmo sendo ensaios diferentes, as duas sondas cobrem parte do éxon 4 do gene *MECP2*.

Todas as reações de qPCR foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Mayo e colaboradores (2010), a quais continham 20 ng de DNA do paciente, 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 0,5 µL de sondas e iniciadores da região específica TaqMan *MECP2*, 0,5 µL da sonda de controle positivo interno TaqMan RNaseP e, por fim, água ultrapura livre de Nuclease, completando o volume final total para 20 µL. A amplificação foi realizada num sistema de PCR em tempo real StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) com um sistema de ciclagem realizado com temperatura inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto (53). Em todas as corridas de qPCR foi utilizada uma amostra feminina simulando um controle positivo de duplicação.

Os valores de Ciclo Quantitativo (Cq) foram gerados a partir de um limiar pré-estabelecido e ΔCq (delta-Cq) foi calculado a partir da diferença entre os valores de Cq do gene controle do número de cópias e da região alvo (Figura 4). Em cada placa foi utilizado um controle negativo de amplificação (água ultrapura no lugar do DNA) e também uma amostra calibrador doada de um voluntário do sexo feminino, como controle positivo, pois é sabido que o gene de interesse está em duplicata em mulheres devido a existência dos dois cromossomos X. Todas as reações foram feitas em triplicata.

Para as análises dos resultados gerado pela qPCR foi utilizado o software CopyCaller (Applied BioSystems, EUA). Através dele foi gerado um número de cópias calculado (CCN) de cada amostra, sendo este obtido mediante a multiplicação da quantidade relativa ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$) estabelecida na reação e o número de cópias de um calibrador, que nada mais é do que uma amostra com número de cópias previamente conhecido (54). Em seguida, fez-se a comparação entre grupos de referência e grupos de interesse pelo cálculo de $\Delta\Delta Cq$ ($\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ amostra} - \Delta Cq \text{ referência}$) (Figura 4). Os grupos foram tomados a partir do número de cópias predito para as regiões genômicas, sendo que os indivíduos testados que apresentassem duas cópias do gene alvo foram considerados como Duplicados, visto que o normal seria apenas uma cópia advinda do único X que seria o normal.

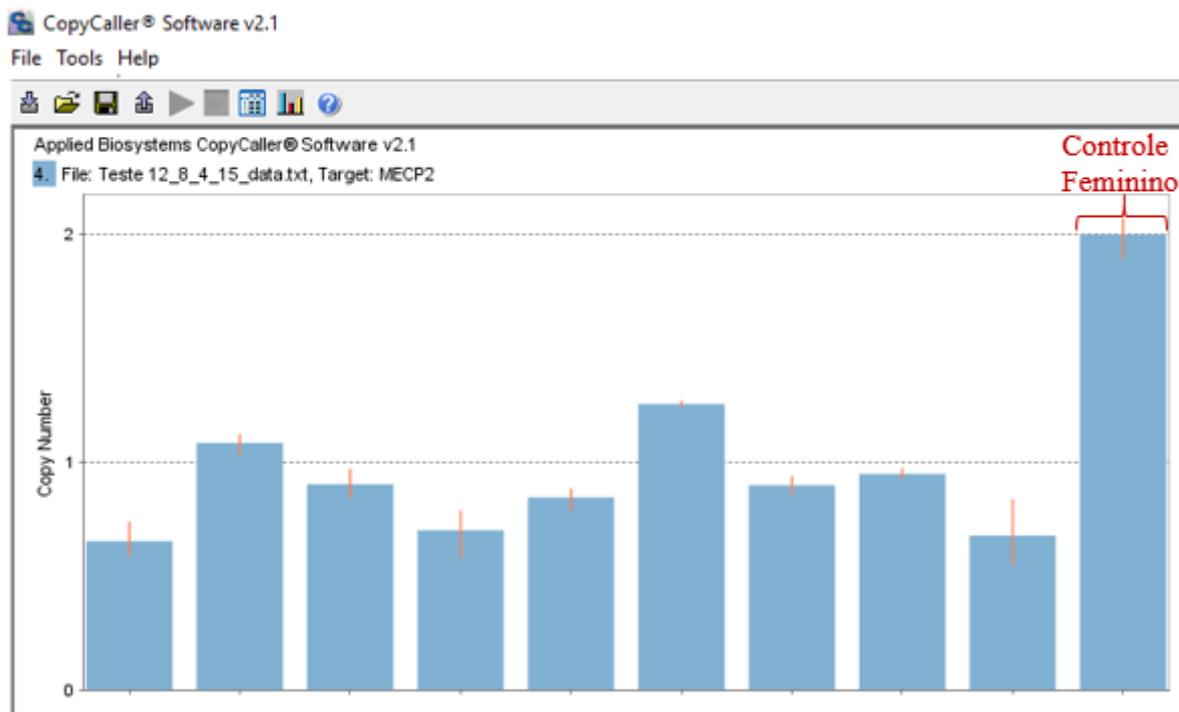


Figura 4. Plataforma de análise do programa CopyCaller®. Exemplo de resultados de pacientes sem alterações de número de cópias. A barra azul à direita representa o controle feminino.

3.4 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

Utilizada para a detecção de deleções e/ou duplicações gênicas, esta técnica é atualmente bastante realizada na rotina de diagnósticos clínicos. Utilizamos a técnica de MLPA para validação de resultados obtidos pela PCR em tempo real. Foi utilizado o kit P064 (MRC-Holland), seguindo recomendações do fabricante como se segue. Esse kit contém duas sondas para o gene *MECP2* além de sondas de outros genes relacionados a síndromes de microdeleção (Figura 5).

O protocolo de MLPA é baseado em 4 etapas bem definidas:

3.4.1 Etapa 1 – Desnaturação

Foi adicionado 8 µl da amostra contendo de 50 a 250 ng em um tubo 0,2 µl. Este tubo foi colocado no termociclador, modelo *Veriti Thermal Cycler*, no programa de desnaturação no qual o ciclo é de 10 min à 98°C.

3.4.2 Etapa 2 - Hibridização

Foi feito um tampão de hibridação contendo 1,5 µl de MLPA Buffer e mais 1,5 µl de sonda, respectivamente para cada amostra feita. Após vortexado, 3 µl deste mix foi adicionado aos tubos ainda no termociclador. Depois de homogeneizados, continuou se o programa de hibridização com um ciclo de 1 minuto à 95°C e 16 horas à 60°C.

3.4.3 Etapa 3 - Ligação

Passadas as 16 horas de hibridização, foi feito um outro mix contendo 25 µl de água ultrapura, 3 µl de Ligase Buffer A, 3 µl de Ligase Buffer B e 1 µl de Ligase-65 Enzyme, para cada amostra. Imediatamente após a realização do mix foi mudado o programa do termociclador para 54°C. Chegada à esta temperatura, foram adicionados 32 µl do mix em cada um dos tubos. O ciclo utilizado foi de 15 minutos à 54°C, 5 minutos à 98°C e infinito à 20°C.

3.4.4 Etapa 4 - Reação de PCR

Foi preparado um mix de PCR contendo 7,5 µl de água, 2 µl de SALSA PCR primer mix e 0,5 µl de SALSA Polymerase, para cada tubo novamente. Depois de bem vortexado foi adicionado 10 µl do mix de PCR em cada tubo e iniciado o programa de PCR que foram de 35 ciclos, sendo cada um dos ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 60°C, 30 segundos à 72°C e 20 minutos à 72°C. Ao fim dos 35 ciclos o termociclador manteve a máquina à 15°C até a retirada das amostras.

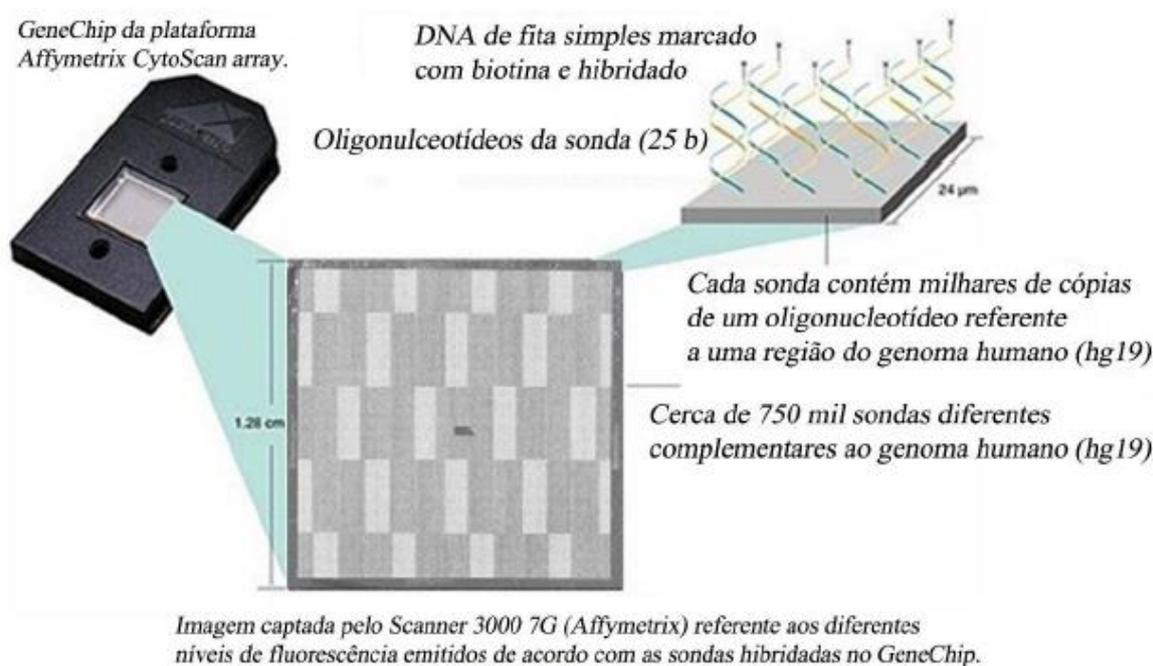


Figura 6. Hibridização das sondas alvo no *GeneChip* (Affymetrix, EUA).

O processo metodológico é subdividido basicamente em 8 etapas distintas.

3.5.1 Preparação do DNA genômico

Após extraído, o DNA do paciente, foi quantificado no *NanoDrop®* e diluído em *Low EDTA TE buffer* (Affymetrix, EUA) à uma concentração de 50 ng/µl total de DNA. Este protocolo utiliza um sistema contendo 16 reações, sendo 14 delas as amostras alvos, um controle positivo, fornecido pela Affymetrix e um controle negativo.

3.5.2 Digestão com *Nsp I*, ligação de adaptadores e amplificação

O DNA dos pacientes e os controles foram submetidos à digestão em sítios específicos com a enzima *Nsp I*, gerando assim fragmentos de DNA de tamanhos variados. Foi utilizada uma mistura de 5 µl de DNA (50ng/µL), 11,55 µL de água ultrapura, 2,00 µL de tampão da *Nsp I* (10X), 0,20 µL de albumina bovina sérica (BSA) (100X) e 1,0µl da enzima *Nsp I* (10 U/µL). Esta solução foi colocada no termocilador *Veriti®* por 2 horas à 37°C e 20 minutos 65°C. O produto desta digestão foi armazenado à -20°C até sua utilização no seguinte procedimento. Posteriormente foi

promovida a ligação de adaptadores com a *T4 DNA Ligase*, cuja função é auxiliar na amplificação das amostras através de uma PCR. No produto já digerido foi acrescido 0,75 µL de adaptador *Nsp I* (50 µM), 2,50 µL de tampão da *T4 DNA Ligase* (10X) e 2,00 µL da enzima *T4 DNA Ligase* (400 U/µL). Obedecendo um ciclo de 3 horas à 16°C e 20 minutos à 70°C esta mistura foi colocada novamente no termociclador, sendo posteriormente diluída com 75 µL de água ultrapura e armazenada à -20°C. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores *Nsp I* foram submetidos à reação da PCR com a utilização de 39,5µL de água ultrapura, 10,0 µL de tampão da *TITANIUM™ Taq* (10X), 20,0 µL de reagente *GC-Melt*, 14,0 µL de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5µL do iniciador PCR Primer 002 (100µM) (*Affymetrix*, EUA) e 2,0 µL da enzima *TITANIUM™ Taq DNA polimerase* (50X) (*Clontech*, EUA). As reações de PCR foram realizadas em quadruplicatas para cada amostra, visando aumentar a quantidade de DNA genômico. Estas quadruplicatas foram colocadas no termociclador para a realização da PCR, onde o processo foi de 1 ciclo de incubação à 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

Para a confirmação do sucesso da digestão, ligação e PCR, o produto final foi visualizado em gel de agarose 2% em TBE 1X corado com brometo de etídio (5mg/mL) submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h, sendo observado fragmentos como um arraste entre 150 a 2000 pb. A imagem foi capturada utilizando o sistema de vídeo-documentação *ImageMaster®VDS – Video-documentation System* (*Pharmacia Biotech*, EUA). Os produtos das PCRs foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

3.5.3 Purificação e Quantificação

Os produtos das PCRs das quadruplicatas de cada amostra foram reunidos em um único tubo (volume final 397 µL) e os fragmentos de DNA foram capturados com o uso de esferas magnéticas. Após incubação e centrifugação, as esferas magnéticas contendo fragmentos de DNA aderidos a sua superfície foram selecionadas por força magnética na *MagnaRack™* (*Life Technologies*, EUA), lavadas com tampão da purificação (*Affymetrix*, EUA) e, finalmente, os DNAs eluídos em tampão de eluição

(*Affymetrix*, EUA) para um volume final de 47 μL . O material foi quantificado *no espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA)*. Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os produtos das PCRs purificados foram armazenados a -20°C .

3.5.4 Fragmentação dos produtos das PCRs

Foi preparado um mix de fragmentação com 123.5 μL de água ultrapura, 158,4 μL de tampão de fragmentação 10x (*Affymetrix*, EUA) e 5,8 μL do reagente de fragmentação (2,5 U/ μL), do qual foram adicionados 10 μL nos produtos de PCR. Esta mistura foi colocada no termociclador em um ciclo de 35 minutos a 37°C e 15 minutos a 95°C . A fragmentação (volume final: 55 μL) foi observada pela presença de um arraste entre 25 e 125 pb em eletroforese em gel de agarose 4% em TBE 1X corado com brometo de etídio (5mg/mL) submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10 V/cm, por 1h. A imagem foi capturada utilizando o sistema de vídeo-documentação. Os fragmentos obtidos foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

3.5.5 Marcação do DNA fragmentado com biotina

A marcação das amostras foi realizada com a mistura de 51 μL do DNA fragmentado e 19,5 μL da mistura de marcação formada por 14,0 μL de tampão *Terminal deoxynucleotidyl Transferase (5X)*, 2,0 μL de reagente de marcação de DNA 30 mM (biotina) e 3,5 μL da enzima *TdT* (30 U/ μl). A mistura foi colocada no termociclador por quatro horas a 37°C e 15 minutos a 95°C . O DNA marcado com biotina foi armazenado a -20°C até o próximo passo.

3.5.6 Hibridação

Primeiramente foi preparada a mistura de hibridação com os tampões de hibridação parte 1 (165,0 μL), parte 2 (15,0 μL), parte 3 (7,0 μL) e parte 4 (1,0 μL), mais 2,0 μL de OCR (*Oligo Control Reagent, Affymetrix, EUA*). Em seguida foi realizada a mistura de 70,5 μL de DNA biotinilado e 190 μL da mistura de hibridação. Esta mistura foi aquecida no termociclador à 95°C por 10 minutos e resfriada à 49°C até o próximo passo. Ainda no termociclador, 200 μl da mistura desnaturada foi

depositada imediatamente em cada um dos *GeneChip*® com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os *GeneChip*® com o DNA foram incubados em forno de hibridação (modelo *Hybridization Oven 645*, *Affymetrix*, EUA) à 50°C durante 17 horas à 60 rpm.

3.5.7 Lavagens dos *GeneChip*® e marcação com fluoróforos

A lavagem e marcação dos *GeneChip*® foi realizada na estação automatizada *Fluidics Station 450* (*Affymetrix*, EUA) a qual foi previamente abastecida com os tampões de lavagem A e lavagem B (*Affymetrix*, EUA) e água ultrapura. Foram preparados também os tubos contendo os tampões de marcação 1 (500 µL), 2 (500 µL) e 800 µL de *holding buffer* que apresentam em suas formulações os elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotilado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos *GeneChip*® com o laser. Em seguida, os *GeneChip*® são retirados do forno de hibridação e, imediatamente, colocados (oito por vez) na estação fluídica onde as sequências de lavagens e marcações por fluoróforos dos microarranjos são automatizadas sob controle do software *Affymetrix GeneChip® Command Console™* (AGCC) versão 4.1.2 (*Affymetrix*, EUA).

3.5.8 Escaneamento dos *GeneChip*® e Análise

Os chips com microarranjos foram colocados no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (*Affymetrix*, EUA), gerenciado pelo programa AGCC. A imagem dessa leitura foi observada com o programa de visualização *Affymetrix GeneChip Viewer*, onde também se pôde verificar os controles positivos do sistema confirmando que as condições de hibridação do microarranjo foram adequadas.

Após estes procedimentos, utilizando o software de análise *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* versão 3.0, foi possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigidade) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido gratuitamente no sítio do fabricante (www.Affymetrix.com) e trabalha com a interface do *Microsoft Windows 7 Professional®* e *Windows 8.1®*. Ele permite converter e normalizar os dados brutos obtidos dos diferentes níveis de fluorescência em cada

sonda hibridada no *chip* (formatados pelo *GeneChip Viewer*) em arquivos “.CEL”. Estes, por sua vez, são transformados pelo *ChAS* em arquivos “.CYCHP”, através da combinação de algoritmos específicos, com os dados das fluorescências de cada sonda, representando cada região do genoma humano, disponíveis no banco de dados *NetAffx® Genomic Annotation file NA33.1* (hg19). Este sistema de comparação de hibridação sustenta a plataforma *CytoScan™* e contém informações atualizadas dos bancos de dados genômicos *Database of Genomic Variants* (DGV), *OMIM®* e *RefSeq* (Figura 7).



Figura 7 . Esquema resumido das etapas realizadas na técnica de CMA-Array (*Affymetrix*, EUA).

Os resultados foram analisados de forma comparativa com as alterações genômicas e fenotípicas disponíveis no DECIPHER, um banco de dados de indivíduos com quadros clínicos conhecidos disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk/application>, além de análises comparativas com os demais bancos externos *NCBI*, *UCSC Genome Browser*, *Ensembl*, *OMIM*® (Figura 8).

Este conjunto de ferramentas de bioinformática fornece informações que auxiliam na classificação destas CNVs em não patogênicas, possivelmente patogênicas ou VOUS, de acordo com o proposto por Miller (2010)(55).

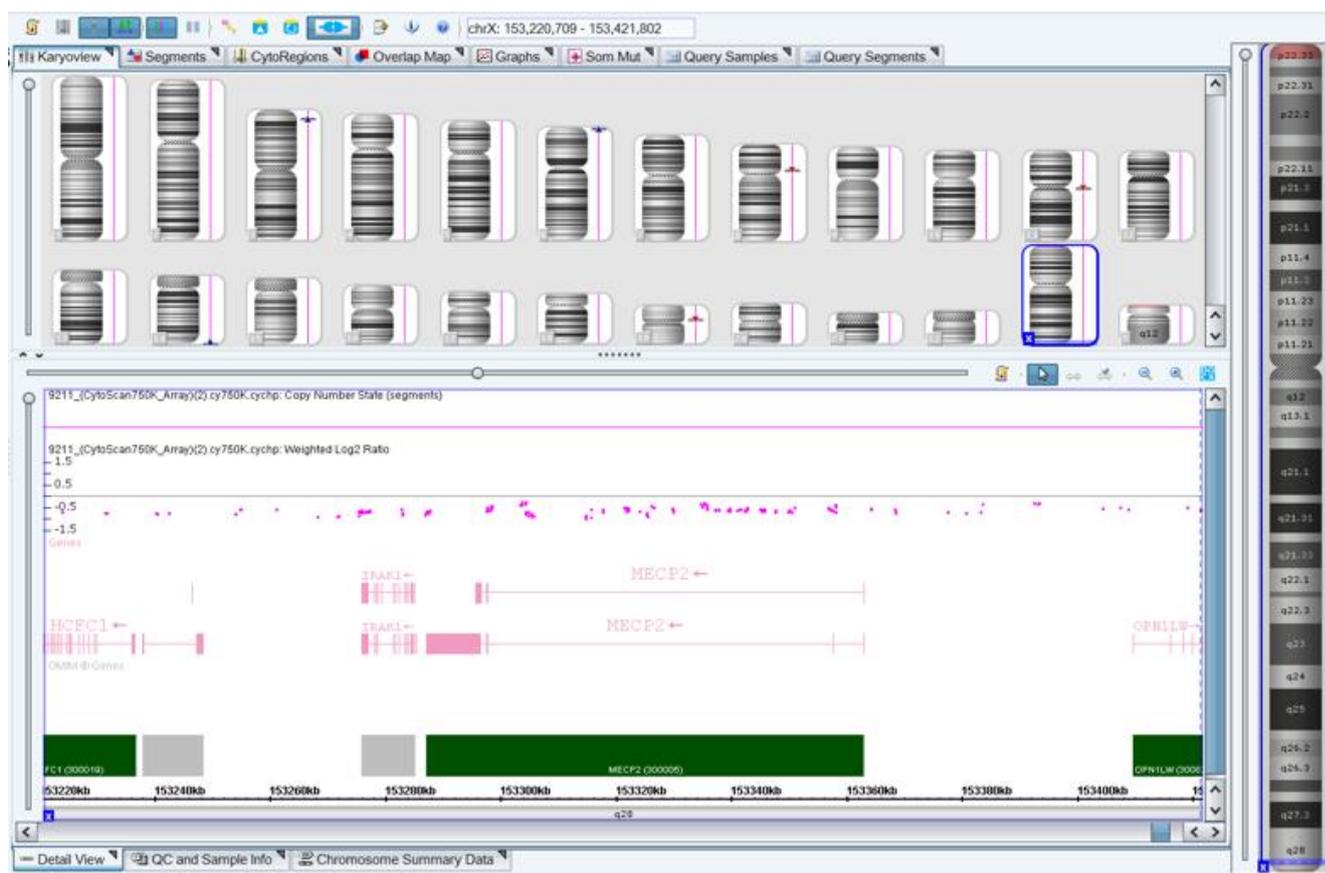


Figura 8. Análise pelo software *ChAS* de um paciente sem alterações patogênicas (*Affymetrix*, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

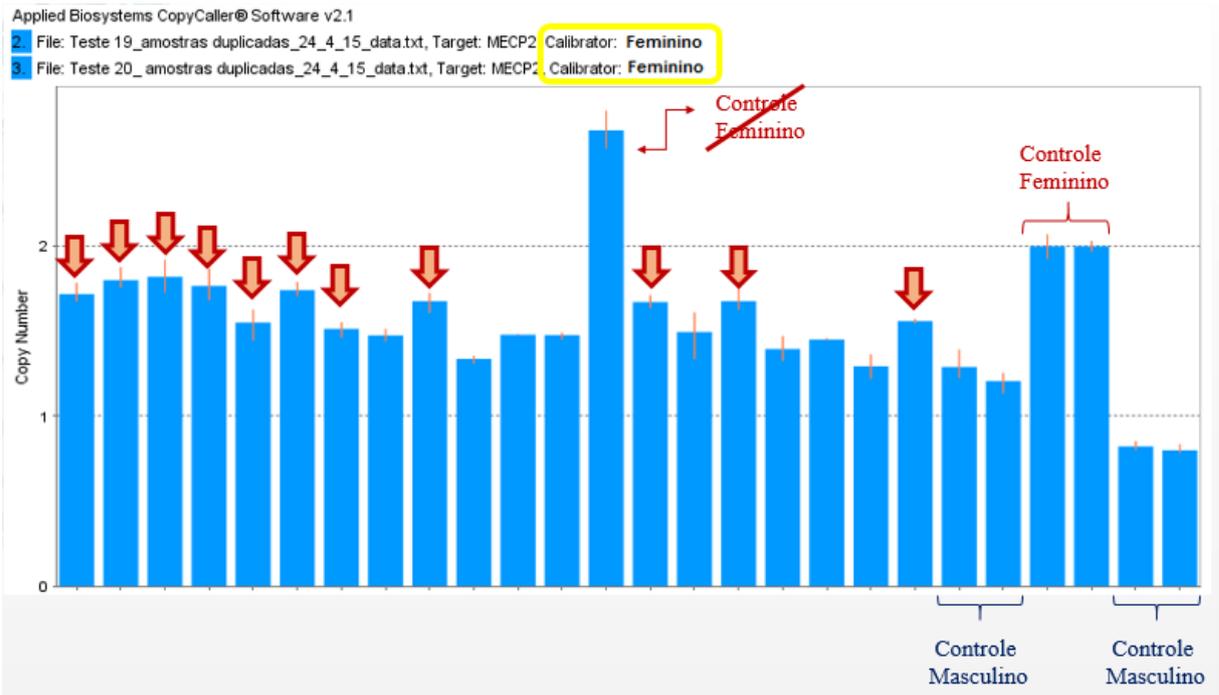
Neste trabalho foi utilizado um número amostral de 138 pacientes do sexo masculino com DILX, que foram triados quanto ao número de cópias do gene *MECP2* por qPCR.

O primeiro ensaio selecionado, apesar de ser vendido como um ensaio validado, não funcionou adequadamente havendo competição entre a sonda teste e a sonda controle, mesmo após diversas alterações no protocolo sugeridas pelo fabricante.

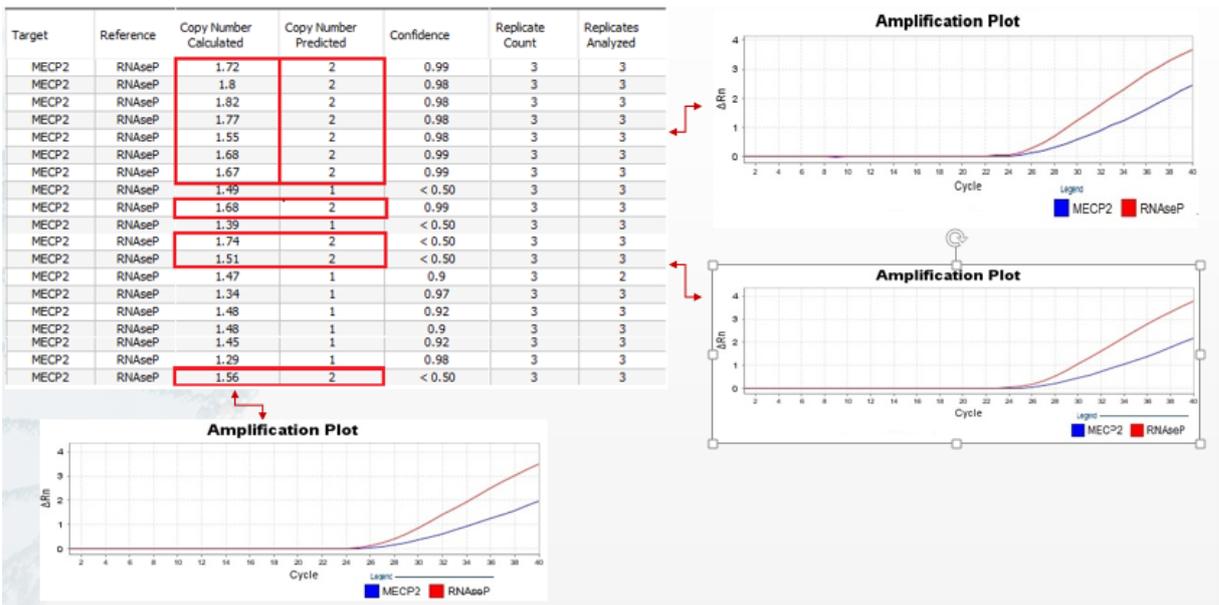
Iniciamos então os experimentos com o segundo ensaio que mostrou resultados consistentes quando analisamos indivíduos controle.

Os dados das corridas de qPCR foram analisados com o software CopyCaller® e 11 pacientes apresentaram resultados compatíveis com a duplicação do gene (Figura 9A).

Notamos porém que de acordo com as configurações do programa de análise CopyCaller®, há um valor de número de cópias calculado que é gerado pela multiplicação da quantidade relativa ($RQ=2^{-\Delta\Delta Cq}$) estabelecida na reação e o número de cópias do calibrador usado, mas pelo fato de muitas vezes esse número ser decimal, os valores acima de 1,5 são imediatamente considerados como 2 cópias do gene (Duplicação), gerando então o que é chamado de Número de Cópias Prováveis (Figura 9B). Por este motivo foi possível observar que devido a este arredondamento várias amostras foram consideradas duplicadas apesar do valor estar próximo de 1,5. Utilizamos como calibrador uma amostra controle feminina.



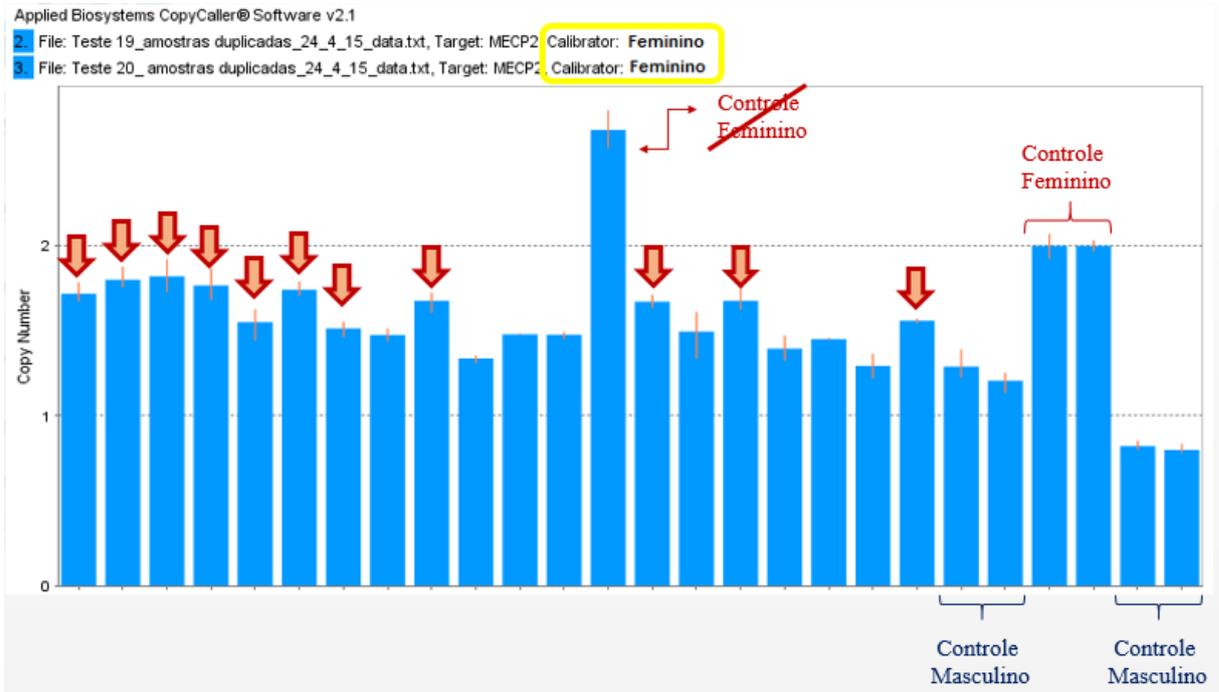
A



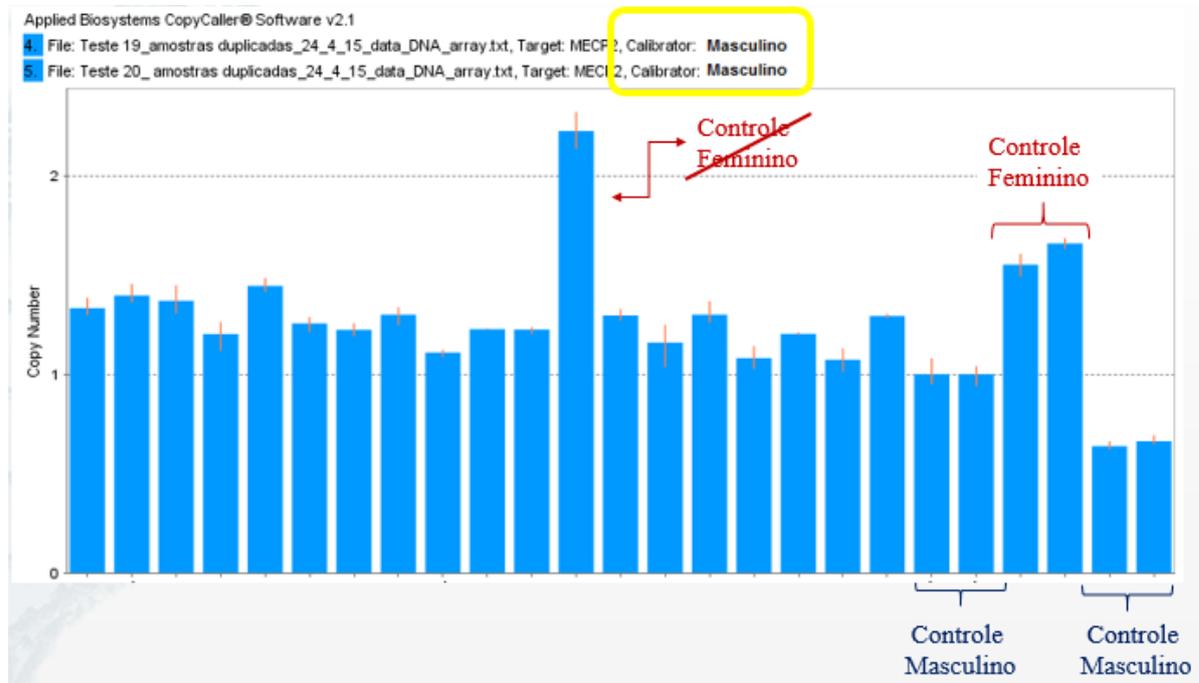
B

Figura 9. A) Análises dos resultados da qPCR demonstrando as 11 duplicações encontradas, juntamente com os controles masculinos e o controle feminino utilizado em todas as reações. **B)** Demonstrativo do arredondamento de 1 cópia para 2 cópias nos casos de decimais superiores à 1,5 do Número de Cópias Calculadas, sendo que quando comparadas com os resultados das corridas de qPCR é possível notar que as amostras com menor número de cópias calculadas que foram arredondadas não poderiam estar duplicadas segundo suas amplificações.

No entanto, quando utilizamos um calibrador masculino o número de amostras consideradas duplicadas caia para zero (Figura 10A e 10B).



A



B

Figura 10. A) Análise dos resultados da qPCR com o calibrador de uma mulher possuidora das duas cópias do gene *MECP2* (Controle feminino) originando as 11 duplicações anteriormente encontradas; **B)** A mudança do resultado para nenhuma duplicação quando utilizado um calibrador masculino.

Apesar da análise com o calibrador masculino nos parecer mais preciso decidimos realizar uma análise confirmatória das 11 amostras duplicadas utilizando outra metodologia. Por ser uma técnica já bem estabelecida e precisa, foi utilizada o MLPA. A análise de número de cópias por MLPA utilizando o kit P064 não revelou duplicação do gene *MECP2* em nenhuma das 11 amostras investigadas. Também não foram encontradas variações de número de cópias dos demais genes investigados no kit.

A ausência de pacientes com duplicação de *MECP2* dentre os 138 testados sugere uma prevalência dessa mutação na população estudada inferior à reportada na literatura que é em torno de 1% (22) (20).

Na tentativa de confirmar a prevalência destas duplicações em uma amostra ainda maior, utilizamos os resultados de análise cromossômica por microarray do banco de dados do Laboratório de Genética Clínica da UnB. Utilizando os mesmos critérios de seleção anteriores, foram incluídos 127 pacientes dos quais foi averiguada a prevalência de CNVs do gene *MECP2*.

Novamente nenhuma duplicação foi encontrada neste outro grupo de pacientes. Dessa forma, não foi identificada nenhuma alteração de número de cópias do gene *MECP2* nos 267 meninos averiguados.

Nosso estudo se baseou em relatos de uma frequência relativamente alta de duplicações de *MECP2* na literatura quando comparada com outros genes do cromossomo X e autossômicos.

Lugtenberg e colaboradores (2009) realizaram um estudo buscando rastrear mutações em genes do cromossomo X em famílias com DILX. Foram identificadas três famílias com duplicação de *MECP2* correspondendo a 1% das famílias estudadas (22).

Shimada e colaboradores em 2013, realizaram a análise de uma coorte de 700 pacientes, homens e mulheres por meio da técnica de CGH-Array, e encontraram quatro pacientes portadores de duplicações no gene *MECP2*. Uma das duplicações foi identificada em uma menina com quadro de DI grave não síndrômica. A frequência estimada da mutação nesse caso foi em torno de 0,5%. No entanto devemos considerar que foram incluídas mulheres no estudo o que em tese deveria diminuir a frequência dessa mutação. Os autores não referem a proporção exata de homens analisados (21).

Estudos em que os pacientes foram previamente selecionados com base nos achados clínicos encontraram uma frequência maior de duplicações, chegando a 15% (26) (30).

Em nosso trabalho como não identificamos nenhuma alteração de *MECP2* podemos considerar que a frequência de mutações foi menor do que 0,5%, sendo assim menor do que a dos estudos anteriores.

Essa baixa frequência nos mostra que a investigação dessa alteração específica em pacientes com deficiência intelectual não se justifica, mesmo com o custo relativamente baixo, e que outras metodologias de triagem mais ampla do genoma devem ser utilizadas nesses casos.

Os métodos mais utilizados para a busca das causas genéticas de DI são a análise cromossômica por microarray e o exoma com taxas de detecção em torno de 18% para cada um deles (56). Essas metodologias no entanto tem um alto custo e ainda não são utilizadas na rotina diagnóstica em laboratórios brasileiros.

5. CONCLUSÃO

- A busca de CNVs do gene *MECP2* em meninos com DI por qPCR ou pela análise cromossômica por microarray não revelou alterações.
- A frequência de duplicações do gene *MECP2* encontrada nesse estudo foi menor que 0,5% e, portanto, menor do que a encontrada em trabalhos anteriores.
- A triagem para duplicações do gene *MECP2* isoladamente não é um método eficiente para identificação da causa genética da DI em meninos.

6. REFERÊNCIAS

1. Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM, Reeve A, et al. Mental Retardation: Definition, classification and systems of support. 10 th. Mental retardation Definition classification and systems of supports 10th ed. 2002.
2. Vasconcelos MM. Retardo mental. *J Pediatr*. 2004;80:71–82.
3. Ropers HH. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18:241–50.
4. Inlow JK, Restifo LL. Molecular and Comparative Genetics of Mental Retardation. *Genetics*. 2004;166:835–81.
5. Vaillend C, Poirier R, Laroche S. Genes, plasticity and mental retardation. *Behav Brain Res*. 2008;192:88–105.
6. Ropers H-H, Hamel BCJ. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*. 2005;6:46–57.
7. Piton A, Redin C, Mandel J-L. XLID-Causing Mutations and Associated Genes Challenged in Light of Data From Large-Scale Human Exome Sequencing. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2013;93(2):368–83.
8. Gécz J, Shoubridge C, Corbett M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet*. 2009;25(7):308–16.
9. Lubs H a. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*. 1969;21(3):231–44.
10. Richards B V, Sylvester PE, Brooker C. Fragile X-Linked Mental Retardation : the Martin-Bell Syndrome. *J ment Defc*. 1981;25:253.
11. Ceman S, Brown V, Warren ST. Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):7925–32.

12. Robinson WP, Beever C, Brown CJ, Stephenson MD. Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med.* 2001;19(2):175–81.
13. Kalantry S. Recent Advances in X-Chromosome Inactivation. *J Cell Physiol.* 2011;226(7):1714–8.
14. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23(2):185–8.
15. Chahrour M, Zoghbi HY. The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron.* 2007;422–37.
16. Hagberg B. Rett syndrome: Long-term clinical follow-up experiences over four decades. *J Child Neurol.*;20(9):722–7.
17. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat.* 2005;25(3):324.
18. Jost KL, Rottach A, Mildner M, Bertulat B, Becker A, Wolf P, et al. Generation and characterization of rat and mouse monoclonal antibodies specific for MeCP2 and their use in X-inactivation studies. *PLoS One.* 2011;6(11):e26499.
19. Maiwald R, Bönnte A, Jung H, Bitter P, Storm Z, Laccone F. De novo MECP2 mutation in a 46,XX male patient with Rett syndrome. *Neurogenetics.* 2002;4:107–8.
20. Van Esch H. MECP2 duplication syndrome. *Mol Syndromol.* 2012;2:128–36.
21. Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, et al. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 2013;35:411–9.
22. Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, et al. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J*

- Hum Genet. 2009;17:444–53.
23. Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, et al. Real-Time Quantitative PCR as a Routine Method For Screening Large Rearrangements in Rett Syndrome : Report of One Case of MECP2 Deletion and One Case of MECP2 Duplication. *Hum Mutat.* 2004;24:172–7.
 24. Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, Lubs H, Abuelo D, Bier J-AB, et al. Recurrent infections, hypotonia, and Mental Retardation Caused by Duplication of MECP2 and Adjacent Region in Xq28. *Pediatrics.* 2006;118(6):1687–95.
 25. Echenne B, Roubertie A, Lugtenberg D, Kleefstra T, Hamel BCJ, Van Bokhoven H, et al. Neurologic Aspects of MECP2 Gene Duplication in Male Patients. *Pediatr Neurol.* Elsevier Inc.; 2009;41(3):187–91.
 26. Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The MECP2 Duplication Syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2010;152A:1079–88.
 27. Meins M, Lehmann J, Gerresheim F, Herchenbach J, Hagedorn M, Hameister K, et al. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet.* 2005;42:1–6.
 28. Carvalho CMB, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino C a., et al. Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet.* 2009;18(12):2188–203.
 29. Shao L, Shaw C a., Lu XY, Sahoo T, Bacino C a., Lalani SR, et al. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: A study of 5,380 cases. *Am J Med Genet Part A.* 2008;146(17):2242–51.
 30. Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, et al. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet.* 2005;77:442–53.

31. Ylisaukko-Oja T, Rehnström K, Vanhala R, Kempas E, von Koskull H, Tengström C, et al. MECP2 mutation analysis in patients with Mental Retardation. *Am J Med Genet A*. 2005;132A:121–4.
32. Quaderi NA, RR, P.H. M, S.H. T, et al. Genetic and physical mapping of a gene encoding a methyl cpG biding protein, mecp2, to the mouse X chromosome. *Genomics*; 1994. p. 648–51.
33. D’Esposito MD, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, Urso MD, et al. Isolation , physical mapping , and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein , MECP2. *Mamm Genome*. 1996;7:533–5.
34. Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* . Karger; 1996;74:293–4.
35. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJM, et al. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet*. 2004;36(4):339–41.
36. Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 1998;19:187–91.
37. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins: Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem*. 2001;268(1):1–6.
38. Del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward P a, Craigen WJ, Glaze DG, et al. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med*. 2006;8(12):784–92.
39. Van Den Veyver IB, Zoghbi HY. Mutations in the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 cause Rett syndrome. *Brain Dev*. 2001;23:147–51.
40. Moretti P, Zoghbi HY. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders.

Curr Opin Genet Dev. 2006;16:276–81.

41. Shahbazian MD, Zoghbi HY. Molecular genetics of Rett syndrome and clinical spectrum of MECP2 mutations. *Curr Opin Neurol.* 2001;14:171–6.
42. Singh J, Saxena A, Christodoulou J, Ravine D. MECP2 genomic structure and function: insights from ENCODE. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(19):6035–47.
43. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong STC, Qin J, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science.* 2008;320:1224–9.
44. Luikenhuis S, Giacometti E, Beard CF, Jaenisch R. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *PNAS.* 2004;101(16):6033–8.
45. Jung BP, Jugloff DGM, Zhang G, Logan R, Brown S, Eubanks JH. The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol.* 2003;55:86–96.
46. Pearson BL, Defensor EB, Pobbe RLH, Yamamoto LHL, Bolivar VJ, Blanchard DC, et al. Mecp2 Truncation in Male Mice Promotes Affiliative Social Behavior. *Behav Genet.* 2012;42:299–312.
47. Saywell V, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Villard L, Cozzone PJ. Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340:776–83.
48. Armstrong J, Pilar P, Merce` P, Aibar E, Gea´n E, Catala` V, et al. Classic Rett Syndrome in a Boy as a Result of Somatic Mosaicism for a MECP2 Mutation. *Development.* 2001;692.
49. Subramaniam B, Naidu S, Reiss AL. Neuroanatomy in Rett syndrome : Cerebral cortex and posterior fossa. *Neurology .;* 48:399–407.

50. Balmer D, Goldstine J, Rao YM, Lasalle JM. Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J Mol Med*. 2003;81:61–8.
51. Cohen DRS, Matarazzo V, Palmer AM, Tu Y, Jeon OH, Pevsner J, et al. Expression of MeCP2 in olfactory receptor neurons is developmentally regulated and occurs before synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2003;22:417–29.
52. Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol [Internet]*. Elsevier Inc.; 2009;219:104–11.
53. Lins TCL. Variação estrutural no número de cópias e sua implicação na expressão de microRNA em humanos. Universidade de Brasília; 2014.
54. Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Sun G, Ramakrishnan R, et al. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods*. Elsevier Inc.; 2010;50:271–6.
55. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*. The American Society of Human Genetics; 2010;86(5):749–64.
56. Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, et al. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation-A study of 150 Finnish patients. *Am J Med Genet Part A*. 2010;1398–410.

ANEXO A - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

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

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 081/2009.

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

Pesquisador Responsável: Iris Ferrari.

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

Data de entrega: 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

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

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

PARECER

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

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

Brasília, 26 de Novembro de 2009.


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

