

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Genética molecular das Perturbações do Espectro do Autismo:
Análise de variantes estruturais

DISSERTAÇÃO

Joana Isabel Neto Coelho

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Genética molecular das Perturbações do Espectro do Autismo
Análise de variantes estruturais

Joana Isabel Neto Coelho

Dissertação orientada pela Doutora Astrid Moura Vicente (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e Instituto Gulbenkian de Ciência) e pela Prof.^a Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2012

Resumo

As Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) são um grupo de doenças com uma forte etiologia genética que afectam o neurodesenvolvimento, caracterizando-se por dificuldades na interação social e comunicação e comportamentos repetitivos e estereotipados, sendo o seu diagnóstico baseado nos critérios presentes nos manuais de diagnóstico, como o DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). AS PEA têm uma elevada prevalência, o que torna importante o seu estudo genético, tendo já sido executados estudos em gémeos e famílias, análises citogenéticas, estudos de *Linkage* e de Associação, sequenciação de genes candidatos e do exoma e análise de variantes estruturais (*Copy Number Variants*, CNV).

O principal objetivo deste trabalho foi a identificação de CNV patogénicos e *loci* de suscetibilidade para o autismo. Para isso, foram analisados os CNV identificados no rastreio genómico efetuado pelo *Autism Genome Project (AGP)*, sendo realizada a validação de alguns dos CNV e identificados os seus pontos de quebra, sendo analisados os genes candidatos presentes e estabelecida uma relação entre o fenótipo clínico das crianças e os genes duplicados ou deletados. Nos CNV que se concluiu serem herdados foi, também, analisado o padrão de transmissão dos CNV herdados e feita uma correlação do seu conteúdo génico com traços autistas dos familiares. Foram ainda estudados os potenciais mecanismos que poderão estar na base do fenótipo de autismo.

No decorrer do estudo, foram inicialmente escolhidos os CNV com base no seu tamanho e conteúdo génico, presentes nos cromossomas 3p22.1-22.2, 9q31.1, 11q14.3, 16p13.11-13.12 e 20p13. Para validar estes CNV, foi usada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (*Quantitative Real Time PCR, qPCR*), sendo validadas duas duplicações, uma presente na zona 3p22.1-22.2, como sendo herdada do pai e outra na zona 20p13, que se verificou ser herdada da mãe. Foram ainda validadas as deleções existentes na banda 9q31.1, como sendo de novo e na banda 16p13.11-13.12, herdada numa das crianças e de novo noutra. A deleção na banda 11q14.3 revelou ser um falso positivo em dois indivíduos. Os pontos de quebra foram identificados nos CNV presentes nas regiões 9q31.1 e 20p13, com recurso à técnica de PCR de cadeia longa (*Long Range PCR, LR-PCR*). Além disso, foi realizado um rastreio populacional da duplicação na região cromossómica 9q21.13, em 104 casos de autismo e 265 controlos e foi identificado um novo caso com esta duplicação, tendo sido sequenciados os seus pontos de quebra.

Na análise do fenótipo clínico e da história familiar de cada criança com estes CNV, observou-se uma grande heterogeneidade clínica das PEA, a nível da presença de deficiência mental e dos atrasos do desenvolvimento motor e da linguagem e, alguns deles, tinham uma história familiar de doenças psiquiátricas ou atrasos cognitivos. Depois da análise do padrão de transmissão dos CNV nas famílias em que este era herdado, pode-se concluir que ocorria uma co-segregação com traços autistas ou psicopatologias no indivíduo que transmite o CNV, em duas das famílias estudadas.

Foi ainda realizada uma relação dos fenótipos das crianças com os genes afetados pelos CNV, concluindo-se que a maioria deles continha genes relacionados com o mecanismo de transmissão sináptica ou apresentavam funções importantes relacionadas com o desenvolvimento e plasticidade neuronais, como os genes *ANXA1, SCN11A, MOBP, SLC44A1, GRIN3A, NDE1, NTNA1, PDYN, SIRPA*.

Futuramente é importante identificar um maior número de genes associados às PEA e os mecanismos moleculares envolvidos nesta patologia, o que será possível com o desenvolvimento das técnicas de sequenciação, que permitem identificar mutações genéticas significativas o autismo. Isto poderá permitir a descoberta de novos alvos terapêuticos, bem como o desenvolvimento de um teste genético para o diagnóstico molecular de autismo.

Palavras chave:

Perturbações do Espectro do Autismo | Mapeamento Genético | Caracterização de variantes estruturais | Sequenciação Genómica

Abstract

Autism Spectrum Disorders (ASD) are a group of conditions, with a strong etiology and they consist in a syndrome that affects neurodevelopment. They are characterized by impairments in social interaction and communication and presence of restricted and repetitive behaviours and their diagnostic is based in the diagnostic criteria present in the DSM-V. They have a high prevalence, wich means that it is important their genetic study, wich is based in studies in twins and families, cytogenetic analyses, linkage and association studies, candidate gene and exome sequencing and CNV analysis.

The central objective of this work was the identification of pathogenic CNV and susceptibility loci for autism. There were analysed the CNV identified in the AGP genomic screen, with the validation and breakpoint identification of these CNV, the analysis of the candidate genes present, and the establishment of a relation between the clinical phenotype and the duplicated or deleted genes. It was also analysed the transmission pattern of the heritable CNV, making a correlation with the autistic traces in the family members and studied the potential mechanisms in wich the autism phenotype is based.

In this study, the CNV were chosen based on their size and genetic characteristics and there were chosen the CNV present in the regions 3p22.1-22.2, 9q31.1, 11q14.3, 16p13.11-13.12 e 20p13. To validate the CNV, we used the qPCR technique and there were validated two duplications, one inherited from the father in 3p22.1-22.2, and one in 20p13, inherited from the mother. Three deletions were also validated, one in the 9q31.1, appearing de novo and onde in the 16p13.11-13.12 region, that was de novo in one child and inherited from the mother in the other one. It was also identified a false positive in the 11q14.3 in two individuals. The breakpoints were sequenced with the technique LR-PCR, in two CNV, 9q31.1 and 20p13. Furthermore, we have done a genomic screen of the 9q21.13 duplication, in 104 cases and 265 controls and it was identified a new case with this duplication and the ponto de quebras were sequenced.

Then, we realized a detailed analysis of the clinical phenotype and family history of the children with these CNV, wich conducted to the ASD clinical heterogeneity, presenting mental retardation e impairments in the motor development and of the language and, some of them, have a family history of psychiatric illness or cognitive impairments. We also analysed the transmission pattern of the heritable CNV, wich lead to the conclusion that there was a co-segregation with the autistic traits or pshycopatologies in the individual that transmitted the CNV, in two of the families.

We also stablish a relation between the phenotype of the autistic children and the genes present in the CNV, that were, most of them, related to the synaptic transmission or have important functions in the neuronal development and plasticity, like *ANXA1*, *SCN11A*, *MOBP*, *SLC44A1*, *GRIN3A*, *NDE1*, *NTNA1*, *PDYN*, *SIRPA*.

In future studies, it is important to identificate more genes associated to ASD and the mechanisms envolved, wich will be possible with the development of the sequencing techniques, that allow the identification of significative mutations to autism. This will allow the identification os novel therapeutical targets and the design of a genetic test, that could be involved in autism diagnostic.

Keywords:

Autism Spectrum Disorders| Genetic Mapping| Copy Number Variants characterization| Genomic Sequencing

Agradecimentos

No decorrer deste trabalho, existiram várias pessoas que me auxiliaram e apoiaram e a quem eu quero prestar o meu agradecimento.

À minha orientadora externa, a Doutora Astrid Moura Vicente pela integração neste projeto e pelos conhecimentos e conselhos que me transmitiu que me ajudaram a desenvolver o meu trabalho.

À minha orientadora interna, a Doutora Deodália Dias, pela disponibilidade em esclarecer qualquer dúvida relacionada com a minha tese de mestrado.

Queria também agradecer ao meu grupo de investigação, à Inês, Bárbara, Vânia e Ana Rita, pertencentes ao grupo de investigação em que desenvolvi o meu trabalho, pelo apoio e motivação que me transmitiram. Agradeço, também à técnica Isabel Picanço pelos conhecimentos laboratoriais que me transmitiu que me ajudaram a obter resultados mais positivos.

Quero agradecer aos meus colegas de licenciatura e de mestrado, em especial, à minha melhor amiga Vanessa, com quem partilhei o curso de biologia e que, apesar de seguirmos percursos diferentes, sempre me apoiou naquilo que precisei.

Quero também agradecer a toda a minha família, principalmente aos meus pais que me tornaram naquilo que sou hoje e cujo apoio e ajuda sempre foi incondicional em todas as etapas da minha vida.

Índice

Resumo	I
<i>Abstract</i>	II
Agradecimentos	III
Índice	IV-VI
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	VIII-IX
Abreviaturas e conceitos	X
I. Introdução	1-21
1. Perturbações do espectro do autismo	1-8
1.1 O autismo visto como um espectro	1-2
1.2 Evolução histórica do conceito de autismo	2
1.3 Prevalência	2-3
1.4 Processo de diagnóstico	3-5
1.5 Deficiência mental e outras patologias associadas às PEA	5-7
1.6 Estrutura cerebral alterada e influência do ambiente no fenótipo de autismo	7-8
2. Investigação genética e molecular do autismo	9-13
2.1 Estudos epidemiológicos e análises citogenéticas	9-10
2.2 Estudos de <i>linkage</i> e associação e sequenciação de genes candidatos	11-12
2.3 <i>Autism Genome Project</i>	12-13
3. Estudo de <i>Copy Number Variants</i> no autismo	13-21
3.1 Caracterização e obtenção dos CNV	14-15
3.2 Mecanismos de formação dos CNV	15-17
3.2.1 Recombinação homóloga não alélica mediada por LCR	15-16
3.2.2 Ligação de cadeias não homólogas devido a DSB	16
3.2.3 Rearranjos genómicos que ocorrem durante a replicação	17
3.3 Caracterização e obtenção dos CNV	18
3.4 Influência dos CNV na etiologia das PEA	18-21
3.4.1 Disrupção do mecanismo sináptico e de certos neurotransmissores	19-21
II. Objetivos	22
III. Material e métodos	23-36
1. Colheita de amostras e caracterização clínica dos pacientes	23
2. Selecção dos CNV etiológicamente significativos	23-24
3. Controlo de qualidade das amostras de DNA e dos <i>primers</i>	24-25

4. Descrição geral da técnica de PCR	25
5. Validação dos CNV	26-30
5.1 Desenho dos <i>primers</i> no <i>browser Probe Finder</i>	27-28
5.2 PCR quantitativo em tempo real	28-29
5.3 Análise dos resultados no <i>QBase</i>	30
6. Determinação dos pontos de quebra dos CNV	30-35
6.1 Desenho dos <i>primers</i> no <i>browser Primer 3</i>	31-32
6.2 <i>Long Range</i> PCR	32-33
6.3 PCR normal	33-34
6.4 <i>Nested</i> PCR	34
6.5 Observação dos resultados em gel de agarose	34
6.6 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR	35
6.6.1 Análise dos resultados no <i>software Bioedit</i>	35
7. Correlação com o fenótipo clínico e segregação em famílias	36
IV. Resultados	37-61
1. Escolha de CNV etiologicamente significativos	37-40
2. Controlo de qualidade das amostras de DNA	40
3. Duplicação na banda 3p22.1-22.2	40-43
3.1 Validação do CNV	40-41
3.2 Mapeamento dos pontos de quebra	41-42
3.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família	42-43
4. Duplicação na banda 9q21.13	44-46
4.1 Rastreio populacional em casos e controlos	44
4.2 Mapeamento dos pontos de quebra.....	45
4.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família	46
5. Delecção na banda 9q31.1	47-50
5.1 Validação do CNV	47
5.2 Mapeamento dos pontos de quebra	48-49
5.3 Caracterização clínica e relação com o fenótipo	49-50
6. Delecção na banda 11q14.3	50-52
6.1 Validação do CNV	50-52
7. Delecção na banda 16p13.11-13.12	52-56
7.1 Validação do CNV	52-54
7.2 Mapeamento dos pontos de quebra	54-56

7.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família	56
8. Duplicação na banda 20p13	57-61
8.1 Validação do CNV	57-58
8.2 Mapeamento dos pontos de quebra	58-59
8.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família	60-61
V. Discussão	62-69
1. Papel do <i>GRIN3A</i> nos receptores NMDA	62-64
2. Relevância dos genes <i>NDE1</i> e <i>NTNA1</i> para o autismo	64-66
3. Importância do canal de sódio Nav1.9 na transmissão sináptica	66-67
4. Papel das moléculas de adesão na transmissão sináptica	67-68
5. Controlo da fagocitose na apoptose neuronal pelo gene <i>ANXA1</i>	68-69
VI. Conclusão geral e perspectivas futuras	70
VII. Referencias Bibliográficas	XI-XIX

Anexos

Anexo 1. Avaliação clínica das crianças com autismo.

Anexo 2. Isolamento e contagem de células.

Anexo 3. Extração de DNA de sangue periférico.

Anexo 4. Extração de RNA.

Anexo 5. Controlo de qualidade das amostras de DNA.

Anexo 6. Rastreio populacional da duplicação presente na banda 9q21.13 em casos e controlos.

Anexo 7. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 9q21.13.

Anexo 8. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 9q31.1.

Anexo 9. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 20p13.

Lista tabelas

Tabela 1. Critérios de diagnóstico das perturbações do espectro do autismo do DSM-V.

Tabela 2. Nível das DM.

Tabela 3. Primers usados para a validação dos CNV estudados

Tabela 4. *Mix* usada para as validações dos CNV por qPCR adicionada a cada uma das amostras.

Tabela 5. Protocolo usado para a quantificação absoluta do DNA.

Tabela 6. *Primers* usados para amplificação e sequenciação dos pontos de quebra dos CNV estudados.

Tabela 7. *Mix* usada para amplificação fragmentos amplificados por LR-PCR.

Tabela 8. Programa de amplificação das amostras de DNA pela técnica de LR-PCR.

Tabela 9. *Mix* usada para amplificação dos fragmentos de DNA, amplificados por PCR normal.

Tabela 10. Programa de amplificação dos fragmentos de DNA por PCR normal.

Tabela 11. Programa usado para purificação das amostras com *Exosap*.

Tabela 12. *Mix* usada para sequenciação das amostras previamente purificadas.

Tabela 13. Programa usado para sequenciação das amostras, para que os resultados sejam lidos com recurso ao sequenciador automático.

Tabela 14. Funções dos genes, presentes nos CNV estudados, que têm interesse etiológico para as PEA.

Tabela 15. Informações acerca dos CNV escolhidos.

Tabela 16. Informação clínica do individuo 1.

Tabela 17. Informação clínica do individuo 2.

Tabela 18. Informação clínica do individuo 3.

Tabela 19. Informação clinica dos individuos 6 e 7.

Tabela 20. Informação clinica do individuo 8.

Lista de Figuras

Figura 1. Espectro das PEA.

Figura 2. Principais estruturas cerebrais implicadas no autismo.

Figura 3. Estudo das PEA ao longo do tempo.

Figura 4. Diagrama representativo do processo de aCGH para deteção de CNV

Figura 5. Esquema do mecanismo de NAHR entre os LCR o que resulta nos CNV.

Figura 6. Mecanismo reparação de DSB por NEHJ.

Figura 7. Rearranjos genómicos que ocorrem durante a replicação.

Figura 8. Influência dos CNV no fenótipo das PEA. Os CNV atuam em alelos de suscetibilidade, sobre uma combinação de vários fatores genéticos.

Figura 9. CNV relacionados com o autismo presentes em todos os cromossomas do genoma humano.

Figura 10. Tipos de sinapses do SNC.

Figura 11. Princípios da reação de PCR.

Figura 12. Procedimento seguido em laboratório para validação dos CNV.

Figura 13. Esquema do desenho dos *primers* para validação dos CNV.

Figura 14. Mecanismo de medição da acumulação dos produtos de PCR durante o qPCR.

Figura 15. Procedimentos realizados em laboratório para sequenciação dos pontos de quebra dos CNV.

Figura 16. Esquema do desenho dos *primers* para sequenciação dos pontos de quebra.

Figura 17. Validação da duplicação da banda 3p22.1_22.2 na família 1.

Figura 18. Estratégia de mapeamento dos pontos de quebra nos indivíduos com deleções no cromossoma 3.

Figura 19. Análise da transmissão do fenótipo na família 1.

Figura 20. Gel de agarose com o caso e controlo que têm a duplicação na banda 9q21.13.

Figura 21. Resultados da sequenciação da banda resultante PCR da combinação de *primers ANXA1_1* e *ANXA1_4*.

Figura 22. Análise da transmissão do fenótipo na família 2.

Figura 23. Validação da deleção da banda 9q31.1 na família 3.

Figura 24. Gel de agarose com amostras do indivíduo 3, cujas bandas resultam de várias combinações de *primers*.

Figura 25. Resultados da sequenciação da banda originada pela combinação de *primers CHR9_F5* e *CHR9_R3*.

Figura 26. Validação da deleção da banda 11q14.3 na família 4.

Figura 27. Validação da deleção da banda 11q14.3 na família 5.

Figura 28. Validação da deleção da banda 16p13.11 na família 6.

Figura 29. Validação da deleção da banda 16p13.11-13.12 na família 7.

Figura 30. Estratégia de mapeamento dos pontos de quebra nos indivíduos com deleções no cromossoma 16.

Figura 31. Análise da presença de LCR (>1kb) na possível localização de ambos os pontos de quebra do CNV presente na banda 16p13.11 do indivíduo 6.

Figura 32. Análise da presença de LCR (>1kb) na possível localização do ponto de quebra distal do CNV presente na banda 16p13.11-13.12 dos indivíduos 7 e 7_1.

Figura 33. Análise da transmissão do fenótipo na família 7.

Figura 34. Validação da duplicação da banda 20p13 na família 8.

Figura 35. Gel de agarose com várias amostras da família 8, cujas bandas resultam das combinações de primers *CHR20_F1* e *CHR20_R1*.

Figura 36. Resultados da sequenciação da banda originada pelo *primer CHR20_F7*.

Figura 37. Análise da transmissão do fenótipo na família 8.

Figura 38. Subunidades constituintes do recetor NMDA, incluindo a NR3, codificada pelo gene *GRIN3A*.

Figura 39. Mecanismo de activação do canal Nav1.9 pelo BDNF.

Abreviaturas e conceitos

aCGH	<i>Array-comparative genomic hybridization</i> (Hibridação Genômica Comparativa com Arrays)
ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview–Revised</i> (Entrevista de Diagnóstico de Autismo revista)
ADOS	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i> (Escala de Diagnóstico de Observação de Autismo e Perturbações do Espectro do Autismo)
AGP	<i>Autism Genome Project</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CARS	Childhood Autism Rating Scale (Escala de Classificação do Autismo Infantil)
CDD	<i>Childhood Desintegrative Disorder</i> (Distúrbio desintegrativo da infância)
CNV	<i>Copy Number Variant</i>
CPT	<i>Cell preparation tubes</i>
DM	Deficiência mental
DSM-IV_TR	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Text Revision</i> (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV – Edição Revista)
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V</i> (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (Hibridação In Situ por Fluorescência)
GRIFFITHS	<i>Ruth Griffiths Mental Scale II</i> (Escala II de Ruth Griffiths de desenvolvimento mental)
GWAS	<i>Genome wide association studies</i> (Rastreamento Genômico de Associação)
ICD-10	<i>International Classification of Mental and Behavioral Disorders</i> (Classificação Internacional de Doenças e Problemas de Saúde)
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge
kb	Kilobase
LR-PCR	<i>Long Range PCR</i> (PCR de cadeia longa)
Mb	Megabase
MOBP	<i>Myelin associated oligodendrocyte basic protein</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NAHR	Non-allelic homologous recombination (Recombinação homóloga não alélica)
PEA	Perturbações do Espectro do Autismo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerase em cadeia)
PDD	Pervasive developmental disorders (Perturbações globais do desenvolvimento)
PDD-NOS	<i>Pervasive developmental disorder-not otherwise specified</i> (Perturbações globais do desenvolvimento não especificadas ou autismo atípico)
PSP-Q	<i>Personality Styles and Preferences Questionnaire</i> (Questionário de Preferências e Tipos de Personalidade)
QI	Quociente de Inteligência
qPCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i> (PCR quantitativo em tempo real)
SNP	<i>Single Nucleotide polymorphism</i>
SRS	<i>The Social Responsiveness Scale</i> (Escala de reciprocidade social)
TASC	<i>The Autism Simplex Collection</i>
TRKB	<i>Tyrosine Kinase receptors</i> (Recetores da tirosina cinase)
WISC	<i>Wechsler Intelligence Scale for Children</i> (Escala de Inteligência de Wechsler para crianças)

I. INTRODUÇÃO

1. Perturbações do Espectro do Autismo

1.1 O Autismo visto como um espectro

O termo Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) é frequentemente usado para referir o conjunto complexo de perturbações a nível do neurodesenvolvimento, que se manifestam como um espectro de problemas linguísticos, cognitivos e comportamentais. As PEA incluem o autismo, a síndrome de *Asperger* e o autismo atípico (*Pervasive developmental disorders not otherwise specified, PDD-NOS*), sendo estes subtipos diferenciados entre si com base na idade em que se manifestam e a sua severidade e sintomas. Assim sendo, para que haja um diagnóstico de síndrome de *Asperger*, a criança não pode manifestar atrasos na linguagem e são colocadas na categoria de diagnóstico de autismo atípico, as crianças cujos sintomas não se enquadram nas duas outras categorias (APA, 2010; Bacchelli & Maestrini, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Lord & Bishop, 2010).

As PEA estão inseridas num grupo mais amplo designado Perturbações Globais do Desenvolvimento (*Pervasive Developmental Disorders, PDD*), do qual também fazem parte a síndrome de *Rett* e o Distúrbio Desintegrativo da Infância (*Childhood Disintegrative Disorder, CDD*), cujo fenótipo clínico não se enquadra nos padrões de diagnóstico das PEA (Figura 1) (OMS, 2010).

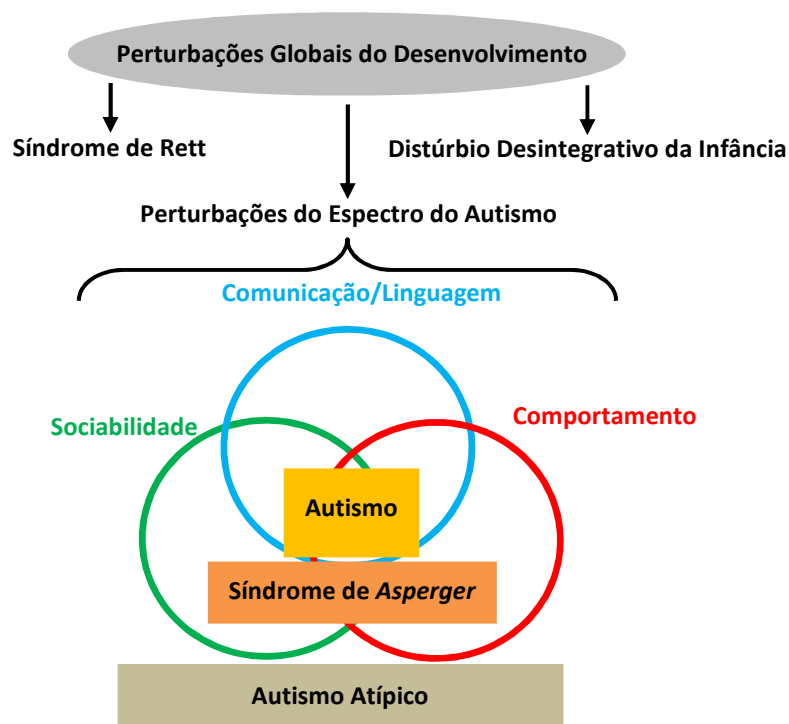


Figura 1. Espectro das PEA (adaptado de EGL, 2012 – online [<http://genetics.emory.edu/egl/featuredtests/index.php/1643>]).

As PEA manifestam-se, geralmente, antes dos três anos de idade e o seu espectro clínico caracteriza-se por vários graus de atraso ao nível da interação social, dificuldades na comunicação verbal e não verbal e presença de comportamentos repetitivos e estereotipados (Challman *et al.*, 2003; Fombonne, 2005; Geschwind, 2008).

1.2 Evolução histórica do conceito de autismo

Kanner foi o primeiro a usar o termo autismo, descrevendo pormenorizadamente as crianças autistas e esta patologia, que denominou de *Early Infantile Autism*. Estas crianças eram, na maioria, rapazes e tinham dificuldade em relacionar-se com outras pessoas, sendo descritas como autossuficientes e solitárias. Tinham, ainda, dificuldade em usar a linguagem como forma de comunicação e podiam apresentar atrasos na linguagem, além de aprenderem a repetir várias coisas, desde a infância. Revelavam uma excelente memória visual, mas as mudanças nas rotinas, padrões e ordem dos actos do dia a dia podiam levar a criança ao desespero (Kanner, 1943).

Asperger, um ano depois, descreveu crianças que seguiam um curso normal de desenvolvimento, mas com atrasos primários na capacidade de socialização e interação interpessoal e com dificuldades no uso normal do contacto visual e linguagem gestual. Além disso, adquiriam a capacidade de inventar palavras, tinham défices na coordenação motora, resistência a mudanças, ligação exagerada a certos objetos e tinham tendência para obter resultados mais elevados em testes de QI, podendo ser adultos bem sucedidos (Asperger & Frith, 1991).

Mais tarde, houve ainda quem estudasse e descrevesse o autismo, mas foi Michael Rutter que permitiu que este fosse reconhecido como uma doença distinta (Rutter, 1978). Da análise em conjunto de todas estas ideias, evoluiu a atual definição de PEA e PGD e a partir delas foram elaborados os seus critérios de diagnóstico, descritos nos manuais em que se baseia, atualmente, o diagnóstico de autismo, como o DSM-V.

1.3 Prevalência

As estimativas da prevalência global das PEA têm vindo a aumentar ao longo das últimas décadas, afetando esta quatro vezes rapazes do que raparigas (Bacchelli & Maestrini, 2006). Inicialmente eram reportados nos estudos valores compreendidos entre 0,7 e 2,33 por 10000 (Treffert, 1970; Hoshino *et al.*, 1982; Steinhausen, 1986), mas com a aplicação dos critérios de diagnóstico contantes no ICD-10, estas estimativas aumentaram para 8,7 em 10000 (Taylor *et al.*, 1999). Com o aparecimento do manual DSM-IV, as estimativas passaram para valores compreendidos

entre 58,7 e 62,6 em 10000, dos quais, entre 16,8 e 22 são crianças com autismo (Chakrabarti & Fombonne, 2001; Chakrabarti & Fombonne E, 2005; Elsabbagh *et al.*, 2012).

Pensa-se que este aumento, observado a nível mundial, se deva não só a um verdadeiro acréscimo da prevalência, como também, a uma maior consciencialização das pessoas em relação a este problema, ao estabelecimento de critérios de diagnóstico mais inclusivos e a diferenças nos métodos de estudo e na amostragem populacional (Oliveira *et al.*, 2007; Wing & Potter, 2002).

Em Portugal, a prevalência de autismo correspondendo a 9,2 em 10000 crianças, havendo uma variação regional nas estimativas de prevalência, o que sugere que fatores como as características genéticas populacionais ou fatores ambientais observados a nível regional possam contribuir para as discrepâncias encontradas (Oliveira *et al.*, 2007).

1.4 Processo de Diagnóstico

Para realizar um diagnóstico de PEA são analisadas várias características clínicas e comportamentais das crianças, que incluem uma descrição detalhada do seu historial clínico e de desenvolvimento, descrições do seu comportamento no dia-a-dia e avaliação direta da sua interação social, comunicação e função intelectual, com recurso a vários testes e de acordo com critérios descritos nos manuais de diagnóstico (Charman, 2008).

Os dois manuais de diagnóstico mais utilizados são o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV – Edição Revista (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV – Text Revision, DSM-IV-TR*) (APA, 2010) e a Classificação Internacional de Doenças e Problemas de Saúde (*International Classification of Mental and Behavioral Disorders, ICD-10*) (WHO, 2010).

O ICD-10 é usado para a classificação de várias doenças, estando algumas delas relacionadas com a saúde mental. Neste manual, as PEA encontram-se inseridas no grupo das doenças mentais e do comportamento, mais propriamente nas doenças relacionadas com o desenvolvimento psicológico e são descritas como um grupo de doenças caracterizadas por anomalias qualitativas na interação social recíproca e nos padrões de comunicação e por interesses e atividades restritos, estereotipados e repetitivos (WHO, 2010).

O DSM-IV-TR é o manual de diagnóstico mais usado por profissionais da área da saúde no diagnóstico de doenças mentais. De acordo com este manual, as PDD são caracterizadas por atrasos severos e limitantes em várias áreas do desenvolvimento, entre as quais a capacidade de interação social recíproca e de comunicação e a presença de comportamentos, interesses e atividades estereotipados. Estas características começam a ser evidentes nos primeiros anos de vida, encontrando-se por vezes associadas a deficiência mental ou outras condições médicas (APA, 2010).

Atualmente, está a ser revisto este manual para o DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*), que vai ser disponibilizado no próximo ano e no qual será feita uma unificação dos critérios de diagnóstico das PEA (Tabela 1), com a existência de vários níveis de severidade da doença (Tabela Suplementar 1). Foi feita esta mudança porque faz sentido diferenciar as PEA de outras doenças que afetam o neurodesenvolvimento, mas que não fazem parte deste espectro, como por exemplo, a síndrome de *Rett*. Por outro lado, uma diferenciação dentro das PEA foi-se tornando inconsistente ao longo do tempo, sendo esta melhor representada como uma categoria única de diagnóstico (APA, 2012 – online [<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>]).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico das perturbações do espectro do autismo do DSM-V (adaptado de APA, 2012 – online [<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>]).

A. Défices persistentes na comunicação e interação social (têm que se manifestar os três seguintes)
1. Défice na reciprocidade socio-emocional: <ul style="list-style-type: none"> • Interação social anormal • Incapacidade de estabelecer uma conversa • Capacidade reduzida de partilhar interesses, emoções e afeto • Ausência de iniciativa de interação social
2. Défice na comunicação não verbal usados na interação social: <ul style="list-style-type: none"> • Reduzida integração entre as comunicações verbal e não verbal • Contacto visual e linguagem corporal anormais • Défice no entendimento e uso da comunicação não verbal • Ausência total de expressões faciais e gestos
3. Défice no desenvolvimento e manutenção de relacionamentos próprios do nível etário: <ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade no ajustamento do comportamento a diferentes contextos sociais • Dificuldade na partilha de brincadeiras imaginativas e em fazer amigos • Aparente ausência de interesse nas pessoas
B. Padrões de comportamento, interesses e atividades restritos e repetitivos (apenas têm que ser manifestados dois dos seguintes)
1. Diálogo, movimentos motores ou uso de objetos estereotipados ou repetitivos: <ul style="list-style-type: none"> • Estereótipos motores simples • Repetição automática de vocalizações • Uso repetitivo de certos objetos e frases idiossincráticas
2. Adesão excessiva a rotinas, padrões ritualizados de comportamentos verbais e não verbais ou resistência excessiva a mudanças: <ul style="list-style-type: none"> • Rituais motores • Insistência na mesma rotina ou alimento e questionamento repetitivo • Stress extremo em pequenas mudanças
3. Interesses anormalmente restritos e fixos, na intensidade ou foco: <ul style="list-style-type: none"> • Forte apego ou preocupação com certos objetos • Interesses excessivamente limitados ou repetitivos
4. Hiper ou hiporeactividade a estímulos sensoriais: <ul style="list-style-type: none"> • Aparente indiferença a algumas sensações • Resposta adversa a sons ou texturas específicos • Fascínio por luzes ou certos objetos
C. Estes sintomas têm que estar presentes no início da infância (podem não se manifestar todos até que as exigências sociais excedam as capacidades limitadas das crianças)
D. Os sintomas em conjunto limitam e prejudicam as atividades do dia-a-dia

São ainda usadas outras ferramentas para fazer uma confirmação do diagnóstico de PEA, entre as quais a Escala de Diagnóstico de Observação de Autismo e Perturbações do Espectro do Autismo (*Autism Diagnostic Observation Scale, ADOS*) (Lord *et al.*, 2000), a Entrevista de Diagnóstico de Autismo revista (*Autism Diagnostic Interview-Revised, ADI-R*) (Lord *et al.*, 1994), a Escala de reciprocidade social (*The Social Responsiveness Scale, SRS*) (Constantino *et al.*, 2003) e o Questionário de Preferências e Tipos de Personalidade (*Personality Styles and Preferences Questionnaire, PSP-Q*) (Hurley *et al.*, 2007), sendo as duas primeiras aplicadas às crianças para avaliar características relacionadas com o fenótipo autista e as duas últimas aos pais, para fazer uma avaliação dos traços autistas, nomeadamente, das características de sociabilidade dos pais. É ainda importante o cálculo do quociente de inteligência (QI), para avaliar se a criança tem deficiência mental (DM) e cujo resultado permite atribuir vários níveis de disfunção cognitiva e que estão descritos na tabela seguinte (Tabela 2) (Emerson *et al.*, 2012).

Tabela 2. Níveis de disfunção cognitiva das DM (adaptado de Emerson *et al.*, 2012).

Nível das DM	
Ligeiro	QI de 50 a 70
Moderado	QI de 35 e 49
Severo	QI de 20 a 34
Profundo	QI inferior a 20

Esta avaliação pode ser realizada com recurso a várias escalas, como a Escala II de *Ruth Griffiths* de desenvolvimento mental (*Ruth Griffiths Mental Scale II, GRIFFITHS*) (Griffiths, 1984) e a Escala de Inteligência de *Wechsler* para crianças (*Wechsler Intelligence Scale for Children, WISC*) (Cruz, 2005). A primeira permite fazer uma integração da capacidade de aprendizagem, desenvolvimento locomotor, ajustamento social e diálogo e coordenação motora da criança, sendo calculado um quociente geral a partir da análise de várias subescalas (Tabela Suplementar 2) e na segunda é feita uma avaliação da capacidade de raciocínio e intelectual, sendo o seu resultado apresentado sob a forma de três quocientes, QI verbal, de execução e total (Tabela Suplementar 3) (Cruz, 2005; Griffiths, 1970; Griffiths, 1984).

1.5 Deficiência mental e outras patologias associadas às PEA

São várias as doenças que surgem nos indivíduos com PEA, o que revela a importância do seu estudo, visto que muitos dos fatores de risco genéticos para o autismo poderão ser partilhados com estas doenças. Assim sendo, o seu diagnóstico nos casos de autismo é muito importante, pois estas podem causar alguns dos sintomas clínicos e aumentar a severidade das PEA e dos atrasos de linguagem observados e aumentar a gravidade dos comportamentos estereotipados e repetitivos das

crianças, permitindo ainda sugerir uma intervenção específica (Leyfer *et al.*, 2006; Matson & Nebel-Schwalm, 2007).

A DM é uma das doenças que mais se observa em conjunto com o autismo, uma vez que, aproximadamente 50% dos indivíduos com PEA, têm um QI abaixo de 70. Esta consiste em défices a nível da função intelectual, aprendizagem e raciocínio. No diagnóstico de deficiência mental, faz-se uma avaliação da capacidade intelectual dos indivíduos, através dos testes de QI e das limitações a nível do desenvolvimento motor, cognitivo ou da fala (Charman, 2008; Emerson & Hatton, 2007; Mefford *et al.*, 2012).

Um dos exemplos de fatores de risco genéticos partilhado pelas PEA e DM são as microdeleções raras observadas na banda 15q13.3, que já foram detetadas em casos de ambas as doenças (Pagnamenta *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 2008).

Existe também um risco acrescido de epilepsia nas crianças com autismo, o que pode denotar a existência de fatores genéticos ou mecanismos patológicos comuns em ambas as doenças. A prevalência de epilepsia nos casos de PEA é cerca de 30%, sendo esta mais elevada nos indivíduos que revelam maiores défices a nível mental, motor e da linguagem (Tuchman & Rapin, 2002). Outro diagnóstico muito comum nas crianças com ASD é o Déficit de Atenção e Hiperatividade (*Attention Deficit Hiperactivity Disorder*, ADHD), sendo este diagnosticado em cerca de 31% das crianças com autismo (Leyfer *et al.*, 2006).

No caso da esquizofrenia, apesar de esta não ser diagnosticada em indivíduos com autismo e ser distinta clinicamente das PEA, pensa-se que, em ambas, o neurodesenvolvimento está afetado, além de partilharem uma elevada heritabilidade e vários fatores de risco genéticos e ambientais (Burbach & Zwaag, 2009). A esquizofrenia é uma doença mental, cujos principais sintomas são psicose, apatia, isolamento e atrasos a nível cognitivo, o que leva a vários problemas a nível pessoal e social (Mueser & McGurk, 2004).

Segundo Cheung *et al.* (2010), existe uma concordância a nível da estrutura cerebral de pacientes com PEA e esquizofrenia, além de já terem sido identificados, noutros estudos, vários CNV recorrentes em casos de autismo e esquizofrenia. Stefansson *et al.* (2008) identificou pequenas deleções nas bandas 1q21.1 e 15q13.3 em pacientes com esquizofrenia, que também já foram consideradas regiões importantes para a etiologia do autismo, por Szatmari *et al.* (2007) e Miller *et al.* (2008).

Também a banda 16p11.2 parece ser importante etiologicamente para ambas as doenças, visto que CNV nesta zona estão associados a casos de autismo e esquizofrenia (McCarthy *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2008).

Cerca de 5% dos casos de autismo estão associados a alterações cromossómicas, sendo mais frequentemente observadas as duplicações 15q11-q13 e as deleções 2q37, 22q11.2 e 22q13.3.

Existem ainda alguns síndromes que estão associados a cerca de 10% dos casos de autismo, sendo o mais preponderante, o síndrome do X frágil. Este observa-se em cerca de 3% a 5% das crianças com PEA, é causado pelo silenciamento do gene *FMR1* e apresenta sintomas como déficit cognitivo e a nível da memória, ausência de certas capacidades executivas, matemáticas e espaciais, por vezes também observados nos casos de PEA (Betancur, 2011; D'Hulst & Kooy, 2009; Freitag *et al.*, 2010; Lintas & Persico, 2009).

Outros síndromes associados às PEA são, por exemplo, a esclerose tuberosa, a qual se observa em 1% a 4% dos casos de PEA e é causada por mutações nos genes *TSC1* ou *TSC2*, cuja principal função é o controlo do crescimento e proliferação celular em vários órgãos, incluindo o cérebro. Pode ainda estar presente em cerca de 0,5% dos casos de autismo, o síndrome de *Rett*, o qual se caracteriza por um desenvolvimento inicial normal, começando as crianças, gradualmente, a perder capacidades motoras e a nível da fala, afastamento social e ausência de contacto visual e de resposta a estímulos sociais (Abrahams & Geschwind, 2008; Caglayan, 2010; Wiznitzer, 2004).

Estão ainda associados ao autismo, mas numa menor frequência, síndromes como a neurofibromatose, provocada por mutações no gene *NF1*, os síndromes de *Angelman* e *Prader-Willi*, devidos a mutações no gene *UBE3A* e o síndrome de *Down*, correspondente a uma trissomia do cromossoma 21 (Betancur, 2011; Caglayan, 2010).

Os casos sindrómicos referidos correspondem a 10% a 20% dos casos de autismo, sendo os restantes designados idiopáticos, os quais correspondem a 80% dos casos de autismo, nos quais a causa não é conhecida (Lintas & Persico, 2009). É sobre estes que incidem principalmente os estudos genéticos e moleculares.

1.6 Estrutura cerebral alterada e influência do ambiente no fenótipo de autismo

Atualmente, na área da neuropatologia do autismo, umas das teorias mais proeminentes é a de que o cérebro destas crianças passa por uma fase de crescimento lento durante o período neonatal, seguido por um crescimento rápido e excessivo do mesmo, que ocorre depois do nascimento. Este crescimento anormal do cérebro nos primeiros anos de vida nas crianças com autismo é entre a 5% a 10% maior, quando comparado com o cérebro de crianças com a mesma idade mas sem o fenótipo autista e parece envolver, principalmente, a matéria branca do cérebro, em detrimento da matéria cinzenta (Amaral *et al.*, 2008 Courchesne *et al.*, 2003).

Existem ainda outras teorias que implicam que várias estruturas cerebrais possam estar afetadas nas crianças com autismo, incluindo o cerebelo, a amígdala, o córtex cerebral, o sistema límbico, o corpo caloso, os gânglios basais e o tronco encefálico (Figura 2) (Akshoomoff *et al.*, 2002).

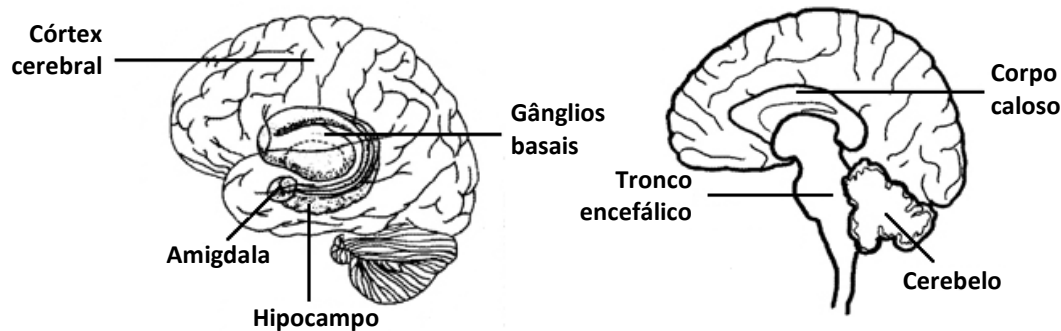


Figura 2. Principais estruturas cerebrais implicadas no autismo (adaptado de NIMH, 2008).

Também a amígdala, que está envolvida na modulação do comportamento social e respostas emocionais, e o cerebelo foram implicados no desenvolvimento das PEA. Os resultados do estudo de Schumann & Amaral (2006) revelam que existe um menor número de neurónios na amígdala das crianças autistas, em comparação com controlos. Além disso, os gânglios basais dos circuitos frontal e subcortical do cerebelo apresentam deformações, que podem contribuir para as incapacidades a nível motor, social e da comunicação (Qiu *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao cerebelo, este também parece ser importante para a etiologia das PEA visto que regula a atividade motora, equilíbrio, coordenação e movimentos corporais e nas crianças autistas, podem ser detetadas anomalias nesta estrutura cerebral, entre as quais um menor número de células de Purkinge (Whitney *et al.*, 2008).

Observadas todas estas alterações a nível do cérebro, sabe-se que estas deverão ser provocadas por fatores genéticos, mas sendo a concordância de autismo em gémeos monozigóticos inferior a 100%, outros fatores deverão interferir no fenótipo de autismo, como os fatores ambientais. Visto haver a grande complexidade das PEA, o mais provável é que estes agentes ambientais contribuam para o aumento da suscetibilidade de alguns indivíduos, o que em combinação com a sua predisposição genética, pode levar ao desenvolvimento deste fenótipo, mas ainda não foi feita nenhuma associação concreta entre o fenótipo de autismo e os agentes ambientais (Daniels, 2006; London & Etzel, 2000).

Apesar disso, existem alguns estudos que sugerem a associação de certos fatores ambientais ao autismo, como a vitamina D ou certos agentes mutagénicos, os quais poderão ter influência no fenótipo, quando ocorre uma exposição do indivíduo num período crítico do desenvolvimento, seja durante a gestação ou nos primeiros anos de vida. A existência de várias combinações de genes e agentes ambientais faz com que o fenótipo de autismo possa ser mais ou menos acentuado (Daniels, 2006).

2. Investigação genética e molecular do autismo

Várias abordagens genómicas têm vindo a sugerir que há uma disrupção de várias vias biológicas importantes funcionalmente no cérebro e SNC nos indivíduos com autismo, alguns dos quais também estão implicados noutras doenças neuropsiquiátricas e que afetam o neurodesenvolvimento. Apesar disso, ainda não foram identificados grande parte dos *loci* que tornam um indivíduo mais suscetível ao autismo (Geschwind, 2011; Kumar & Christian, 2009; Muhle *et al.*, 2004).

Nos estudos de doenças genéticas complexas, entre as quais as PEA, começaram por ser realizadas análises citogenéticas e só mais tarde foram desenvolvidos os estudos de *Linkage* e de Associação, os quais foram realizados numa fase inicial em genes candidatos e depois no rastreio de todo o genoma (Risch *et al.*, 1999). A identificação de fatores de risco genéticos para as PEA tem vindo a ser feita com várias abordagens diferentes ao longo do tempo, como se pode observar na figura seguinte (Figura 3).

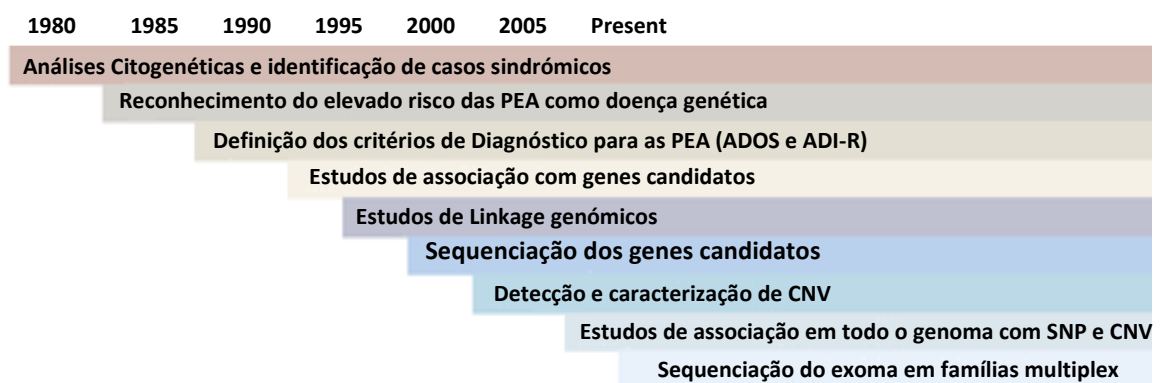


Figura 3. Estudo das PEA ao longo do tempo (adaptado de Abrahams e Geschwind, 2010).

Foram as várias as mudanças efetuadas a nível metodológico no estudo das PEA, que fizeram com que ocorressem avanços significativos na genética do autismo.

2.1 Estudos epidemiológicos e análises citogenéticas

Os estudos realizados em famílias revelaram-se muito importantes para determinar a taxa de autismo nos irmãos e pais das crianças autistas, para ver os padrões de transmissão ao nível da família e assim determinar qual a extensão do fenótipo (revisto em Rutter, 2000). Bolton *et al.* (1994) realizou um dos primeiros estudos em famílias, tendo constatado que a taxa de autismo em irmãos é cerca de 3%, o que revela uma agregação familiar desta patologia.

Foram também realizados estudos em gêmeos, os quais tiveram como principal objetivo verificar se a agregação familiar observada nos estudos de famílias se devia a fatores genéticos ou ambientais. O primeiro estudo deste gênero a ser efetuado em indivíduos com autismo foi o de Folstein & Rutter (1977), no qual foi utilizada uma amostra de 21 pares de gêmeos, que apesar de reduzida, permitiu concluir que havia uma diferença significativa no nível de concordância para o autismo em gêmeos monozigóticos e dizigóticos.

A partir da análise destes estudos epidemiológicos conclui-se que as PEA estão entre as doenças complexas com uma maior heritabilidade, visto o seu nível de concordância ser 60% a 90% nos gêmeos monozigóticos, que partilham uma maior informação genética, sendo que nos dizigóticos corresponde a 2% a 3%. Além disso, foi possível excluir a possibilidade do autismo ser causado por apenas um gene, sendo mais provável ser a interação entre vários genes a responsável por esta patologia, visto que a concordância de autismo em familiares é tanto maior quanto mais próxima for a sua relação de parentesco, o que significa que a partilha de um maior número de características genéticas aumenta a probabilidade de desenvolvimento de autismo (Bacchelli & Maestrini, 2006; Rutter, 2000).

Outra das abordagens realizadas nos estudos de autismo consistiu em análises citogenéticas, tendo-se observado uma progressão no seu estudo, que permitiu aumentar a resolução e sensibilidade destas técnicas. Começaram por ser realizadas Análises de Bandas G (*G-Banding Analysis*) e, mais tarde, outras técnicas, como a Hibridação *In Situ* por Fluorescência (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) e a Hibridação Genómica Comparativa com *Arrays* (*Array Comparative Genomic Hybridization*, aCGH). O estudo das anomalias citogenéticas é muito importante visto que estas podem levar a várias mudanças a nível funcional, devido ao efeito que têm nos genes, como modificações da sua dosagem ou a sua disrupção.

O rearranjo cromossómico mais comum identificado em estudos citogenéticos é a duplicação herdada da mãe presente na região 15q11-q13, a qual ocorre em cerca de 1 a 3% dos pacientes com autismo, observando-se, normalmente, nos indivíduos que apresentam um fenótipo mais severo, com maiores atrasos no desenvolvimento, deficiência mental e alguns dimorfismos. Existem ainda outros rearranjos citogenéticos que têm vindo a ser descritos com uma elevada frequência, sendo exemplos destes os que estão presentes nas bandas 2q37, 5p14, 16q22.3, 7p, 22q11.2, 22q13.3 e Xp22.2-p22.3 (Battaglia, 2005; Castermans *et al.*, 2004; Galasso *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2003; Vorstman *et al.*, 2006).

2.2 Estudos de *Linkage* e Associação e sequenciação de genes candidatos

Nos estudos de *Linkage* e de Associação, o principal objetivo é fazer o mapeamento genético dos *loci* de suscetibilidade para as doenças estudadas, neste caso o autismo. Os métodos usados nos estudos de associação são mais eficientes na identificação de genes com um menor efeito do que os utilizados nos estudos de *linkage*. Ambos os estudos começaram por ser realizados em genes candidatos presentes em zonas previamente implicadas no autismo, passando depois a ser feitos ao nível de todo o genoma com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular.

O método de *linkage* usado para o estudo de doenças genéticas multifatoriais como o autismo é o não paramétrico, no qual vários genes podem contribuir para o risco de ter a doença, não havendo um modelo claro de hereditariedade. São analisados os haplótipos partilhados por indivíduos com algum grau de parentesco entre si e que manifestam a doença, sendo que nas regiões onde há uma partilha de um maior número de haplotipos, considera-se que estão presentes os genes que aumentam a predisposição para a doença em estudo (Teare & Barrett, 2005).

Até à data, já foram identificados vários *loci* de suscetibilidade para o autismo com base nos resultados dos estudos de *linkage*, mais propriamente nas bandas 1q21–23, 2q24–32, 3q25–27, 5p13–14, 7q22–31, 7q34–36, 9q33–34, 11p12–13, 16p13 e 17q11–21, resultados estes que só foram replicados para as bandas 7q22–31 e 17q11–21 (Abrahams & Geschwind, 2008; Auranen *et al.*, 2002; Cantor *et al.*, 2005; IMGSAC, 2001; Risch *et al.*, 1999; Szatmari *et al.*, 2007).

No que diz respeito aos estudos de associação realizados em genes candidatos, é feita uma seleção destes genes com base na sua função ou posição em regiões previamente identificados noutros estudos de autismo. Atualmente, realizam-se estudos de associação ao nível de todo o genoma, designados *Genome Wide Association Studies* (GWAS) e nos quais se faz a análise de vários marcadores em simultâneo. Em cada GWAS, são usados dois grupos de indivíduos, casos e controlos, com características idênticas e as suas amostras de DNA são colocadas em *microarrays*, a partir das quais é obtido o genoma dos indivíduos, com o uso de marcadores selecionados estrategicamente com base na doença que se está a estudar. Durante o processo de genotipagem, ocorre hibridação de sondas específicas às amostras de DNA colocadas nas *microarrays*, sendo cada uma delas marcada com uma fluorescência específica, cuja intensidade permite identificar o genótipo dos indivíduos nas zonas estudadas (Buxbaum *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2008; NHGRI, 2011 – online [<http://www.genome.gov/20019523>]).

Nos estudos de associação já realizados nas pesquisas de autismo, identificaram-se vários genes de suscetibilidade para esta doença, como *AVPR1A*, *CNTNAP2*, *DISC1*, *GABRB3*, *GRIK2*, *MET*, *OXTR*, *RELN* e *SLC25A12* (Abrahams & Geschwind, 2008; Alarcon *et al.*, 2008; Buxbaum *et al.*, 2002;

Campbell *et al.*, 2007; Kilpinen *et al.*, 2008; Lerer *et al.*, 2008; Jamain *et al.*, 2002; Segurado *et al.*, 2005; Serajee *et al.*, 2006; Yirmiya *et al.*, 2006).

A sequenciação de genes candidatos tornou possível a obtenção de evidências do envolvimento de outros genes nas PEA, permitindo identificar mutações raras ligadas ao autismo, como são exemplos as mutações observadas nos genes *NLGN3* e *NLGN4X*, ambas envolvidas na função sináptica. Foram ainda identificadas mutações no gene *SHANK3*, cujo produto interage com as neurolininas, aumentando a probabilidade da sinaptogênese estar relacionada com as PEA. Outros exemplos de mutações identificadas por estes mecanismos são as identificadas nos genes *NRXN1* e *CNTNAP2* (Abrahams & Geschwind, 2008; Jamain *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

Após três décadas de pesquisa na área do autismo, um dos resultados mais marcantes é a descoberta dos CNV, que são uma das fontes de variação estrutural, podem aparecer *de novo* ou ser herdados e têm vindo a emergir como importantes causas das PEA. Estes podem funcionar como variantes raras que modulam o risco para esta doença ou como potenciais novas síndromes que se encontram associados às PEA (Jacquemont *et al.*, 2006; Sebat *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2007).

2.3 Autism Genome Project

Em cada um destes tipos de estudos é importante a existência de projetos de colaboração a nível internacional, visto que permitem que as amostras analisadas tenham um maior tamanho, o que é relevante para o estudo de doenças genéticas complexas, como é o caso do autismo. Um dos exemplos destes projetos que foi desenvolvido especialmente para estudar o autismo a nível genético é o *Autism Genome Project* (AGP).

O AGP é um projeto de pesquisa da base genética das PEA, tendo surgido com os objetivos de fazer a identificação dos fatores genéticos que estão na base desta síndrome, criar o maior bio banco genético para o autismo e fazer um rastreio genómico em famílias de crianças autistas. Incluem-se neste consórcio cerca de 50 centros presentes nos EUA, Europa e Canadá (AGP, 2012 – online [<http://www.autismgenome.org/>]).

Numa primeira fase deste projeto realizou-se um *screen* completo de uma amostra de mais de 1400 famílias *multiplex*, com o uso da plataforma *Affymetrix 10K v2 SNP arrays* e depois fez-se uma análise de *Linkage*, que corresponde à maior alguma vez efetuada em indivíduos com PEA. Na segunda fase, foram genotipadas 3000 famílias *simplex* e *multiplex*, com o uso da plataforma *Illumina 1M beadchip*, fazendo-se depois análises de associação destes dados. Além disso, efetuou-se uma análise e caracterização dos CNV presentes nas amostras e dos dados fenotípicos obtidos, entre os quais, ADI, ADOS, IQ, *Vinlands*, medições corporais e tipo de família e feita a sua relação com os resultados observados a nível genético (AGP, 2012 – online [<http://www.autismgenome.org/>]).

Nos estudos realizados no âmbito deste projeto identificaram-se diversas regiões cromossômicas que parecem contribuir para um risco acrescido de autismo, como é o caso da análise de *linkage* e de CNV realizada por Szatmari *et al.* (2007), no qual foram encontradas evidências de *linkage* nas regiões 2q, 5p, 7q e 9p e permitiu identificar um novo *loci* de suscetibilidade para o autismo na região 11p12–p13. Em relação ao estudo do conteúdo de CNV é de denotar uma importante deleção identificada no gene *NRXN1*.

O *The Autism Simplex Collection* (TASC) consiste num biobanco que surgiu com o objetivo de armazenar estas amostras biológicas que iam sendo obtidas no âmbito do projeto AGP, tendo sido colocada neste toda a informação clínica e genética correspondente aos indivíduos afetados com PEA e aos seus familiares.

3. Estudo de CNV no autismo

Os grandes avanços tecnológicos a nível da investigação molecular nas últimas décadas permitiram um rápido desenvolvimento das tecnologias de *microarrays*, *arrays* de genotipagem de SNP (*SNP genotyping arrays*) e das técnicas de sequenciação. Isto permitiu que se fizesse uma análise completa do genoma com uma boa resolução, com a descoberta, entre outras coisas, dos CNV que contribuem para cerca de 17,7% da variação genética humana, sendo importante o seu estudo nas doenças genéticas complexas como o autismo (Mefford, 2012; Stankiewicz & Lupski, 2010; Stranger *et al.*, 2007).

O autismo é uma doença complexa e heterogénea, no qual são observados efeitos cumulativos de diversas variantes estruturais, que podem incluir CNV, mutações pontuais e rearranjos cromossômicos em combinação com fatores ambientais. Os CNV são uma forma de variação genética nos humanos e podem ou não ser patogénicos. Estes são constituídos por um grande número de nucleótidos, aparecem com uma maior frequência do que os SNP e parecem ser responsáveis por vários mecanismos, entre eles a evolução humana, diversidade genética entre indivíduos e aumento da suscetibilidade para certas doenças (Cook & Scherer, 2008; Korbelt *et al.*, 2007; Stankiewicz & Lupski, 2010).

3.1 Caracterização e obtenção dos CNV

Os CNV são segmentos de DNA com um tamanho compreendido entre 1 kilobase (Kb) e vários megabases (Mb) e representam um desequilíbrio genómico, que altera o balanço biológico normal da diploidia, num determinado *locus*. Estes podem ser deleções, inserções ou duplicações e ocorrem em cerca de 12% do DNA genómico humano. Sabe-se que os CNV tendem a aparecer em regiões com sequências genéticas repetitivas como é o caso dos *Low Copy Repeats* (LCR), estando estes envolvidos na sua formação. Alguns CNV são comuns e transmitidos de geração, enquanto outros aparecem *de novo* e de uma forma recorrente. Pensa-se que os CNV mais raros são os que apresentam uma maior probabilidade de serem patogénicos (Redon *et al.*, 2006; Stankiewicz & Lupski, 2010).

A técnica usada com uma maior frequência para pesquisar CNV é o aCGH, que permite detectar a mudança no número de cópias de um determinado gene. Esta baseia-se na cohibridização de amostras de DNA genómico, coradas diferencialmente, provenientes do indivíduo que está a ser testado e de um indivíduo de referência com as *microarray*, o que permite que seja gerado um sinal. Os sinais de hibridação são determinados ao longo de toda o genoma dos indivíduos testado e de referência e são comparados estes valores, o que fornece informações acerca do número relativo de cópias de cada sequência (Figura 4) (Albertson & Pinkel, 2003; Korbelt *et al.*, 2007; NCBI, 2007 – online [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>]).

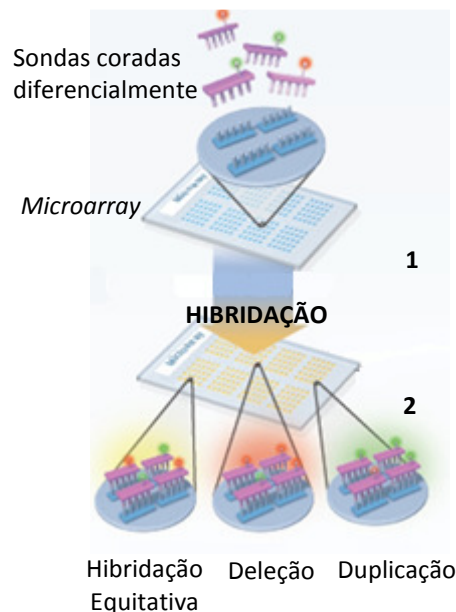


Figura 4. Diagrama representativo do processo de aCGH para detecção de CNV (1. Hibridação do DNA do indivíduo testado e do indivíduo de referência com a microarray; 2. Geração do sinal de hibridação que permite verificar se o CNV está presente (adaptado de Theisen, 2008).

O aCGH consiste numa técnica fiável e com grande resolução e um dos resultados esperados, a longo termo, do seu estudo reside é o diagnóstico molecular de determinadas doenças e a sua integração com as terapêuticas adequadas.

3.2 Mecanismos de formação dos CNV

Os CNV podem ocorrer de uma forma recorrente ou não recorrente, consoante sejam ou não identificados em vários indivíduos diferentes. Geralmente, os rearranjos genómicos que surgem de uma forma recorrente, têm pontos de quebra organizados em *clusters* e resultam do mecanismo de recombinação homóloga não alélica (*Non-allelic homologous recombination*, NAHR). No caso dos rearranjos não recorrentes, os pontos de quebra não se encontram agrupados e estes podem resultar do mecanismo de NAHR ou de outros, como o mecanismo de junção de extremos de cadeias não homólogas (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) e a *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS) (Lee et al., 2006; Shaw & Lupski, 2004; Stankiewicz & Lupski, 2002).

3.2.1 Recombinação homóloga não alélica mediada por LCR

Na maioria das doenças genómicas conhecidas provocadas por duplicações ou deleções de segmentos de DNA, as regiões duplicadas e deletadas são originadas pelo mecanismo de NAHR que ocorre entre os LCR, durante a meiose.

Os LCR são estruturas com 97% a 98 % de homologia e um tamanho superior a 10 kb, que atuam como substratos de recombinação, provocando alterações na cadeia de DNA mediado por eles, o que pode resultar em deleções ou duplicações (Shaw & Lupski, 2004; Gu et al., 2008). Estes podem conter entre um a vários genes, pseudogenes, fragmentos genéticos, sequências retrovirais ou regiões regulatórias e são tanto mais suscetíveis a rearranjos genómicos quanto maior for o seu tamanho e percentagem de similaridade (Lee & Lupski, 2006).

No mecanismo de NAHR ocorre recombinação entre LCR, devido ao seu alinhamento em posições não alélicas, o que leva ao aparecimento de deleções, duplicações e inversões. Esta recombinação ocorre devido aos LCR terem elevada homologia entre si e pode acontecer entre LCR diretos (Figura 5a), o que origina as duplicações e deleções do material genético ou entre LCR invertidos (Figura 5b), o que resulta na inversão da sequência (Gu et al., 2008; Lupski, 2004).

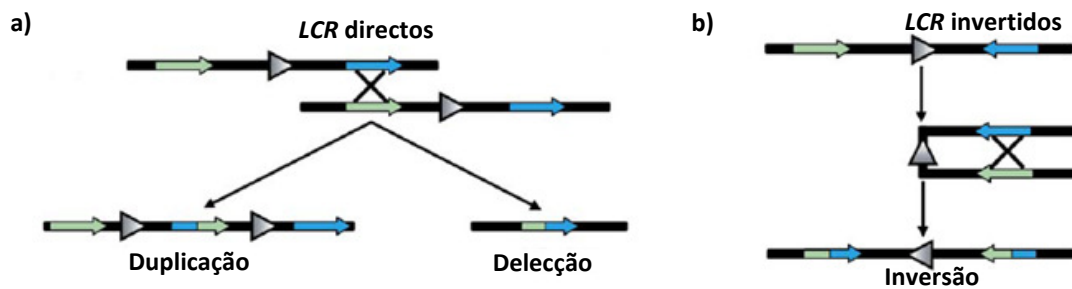


Figura 5. Esquema do mecanismo de NAHR entre os LCR o que resulta nos CNV. **a)** NAHR entre LCR directos (origina duplicações ou deleções); **b)** NAHR entre LCR invertidos (dá origem a inversões) (adaptada de Lee & Lupsky, 2006).

3.2.2 Ligação de cadeias não homólogas devido a *Double Strand Breaks*

O mecanismo de NHEJ é o mais usado para a reparação dos *Double Strand Breaks* (DSB) e, ao contrário do NAHR, não é necessário que haja qualquer tipo de homologia das cadeias de DNA. Os DSB podem aparecer espontaneamente durante a o processo de replicação ou ser induzidos por radiação ionizante ou certos químicos. Durante o NHEJ, há uma ligação entre os extremos das cadeias nucleotídicas onde ocorrem os DSB, o que conduz ao aparecimento de deleções (Figura 6) (Hefferina & Tomkinson, 2005; Pastwa & Błasiak, 2003).

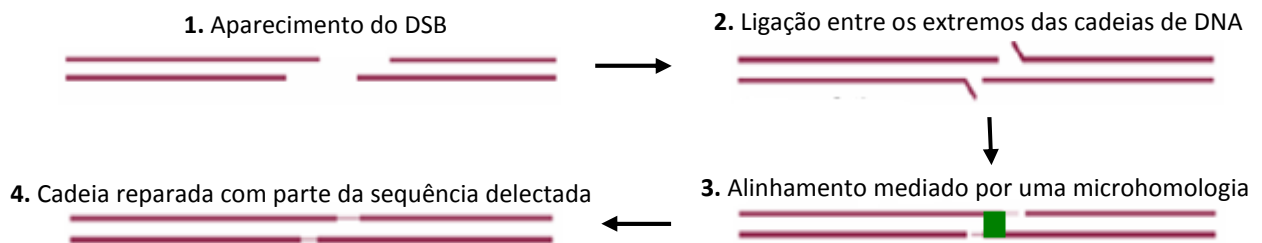


Figura 6. Mecanismo reparação de DSB por NHEJ (quando ocorre uma quebra na cadeia de DNA, os extremos das cadeias podem voltar a alinhar-se, com base numa microhomologia, o que provoca a deleção de parte da sequência) (adaptado de Hefferina & Tomkinson, 2005).

Para fazer a reparação dos DSB, são necessárias proteínas específicas, que tornem possível uma nova ligação entre as cadeias que foram quebradas. Sendo assim, ocorre uma justaposição dos extremos da cadeia onde ocorreu a quebra, o que permite o seu alinhamento com base em sequências semelhantes, a que se dá o nome de microhomologias. Participam ainda neste processo nucleases e polimerases. Uma das consequências deste mecanismo é o aparecimento de *gaps* na sequência, devido ao alinhamento não ser feito exatamente no mesmo local (Hefferina & Tomkinson, 2005).

3.2.3 Rearranjos genómicos que ocorrem durante a replicação

O FosTEs é outro dos mecanismos que provoca o aparecimento de rearranjos genómicos não recorrentes, especialmente deleções, devido à ligação da cadeia transcrita noutra garfo de replicação diferente, mediada pela presença de microhomologias, sendo continuando o processo de replicação num local diferente. Sendo assim, durante a replicação do DNA, o garfo de replicação pára a sua ação numa determinada posição (normalmente em sítios instáveis e próximos de LCR, o que faz com que a cadeia que está a ser replicada se desligue da original e se ligue noutra posição, através de uma microhomologia. Neste novo local, outro garfo de replicação reinicia a síntese de DNA. Este processo pode ocorrer mais do que uma vez durante o replicação, mas os garfos de replicação têm que estar relativamente próximos fisicamente (Figura 7) (Gu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007).

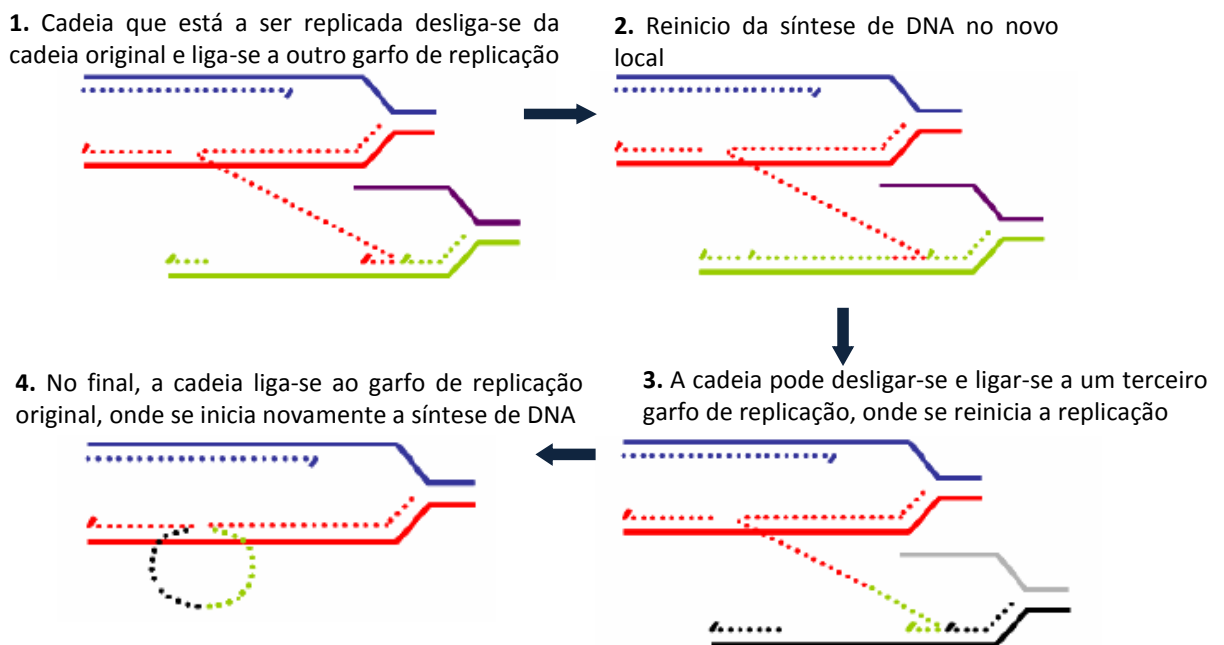


Figura 7. Rearranjos genómicos que ocorrem durante a replicação (primeiro garfo de replicação: cadeia molde é azul e a que está a ser replicada é vermelha; segundo garfo de replicação: cadeia molde é roxa e a que está a ser replicada é verde; terceiro garfo de replicação: cadeia molde é cinzenta e a que está a ser replicada é preta) (adaptado de Gu *et al.*, 2008).

Caso este mecanismo provoque a mudança da cadeia para um garfo de replicação presente num local proximal da cadeia, é originada uma deleção e se a cadeia se ligar a um garfo de replicação localizado distalmente na cadeia, são originadas duplicações, pois são replicadas cadeias de DNA que já tinham sido replicadas. Este mecanismo pode ainda dar origem a inversões, consoante o sentido com que o garfo de replicação reinicia a replicação (Lee *et al.*, 2007; Gu *et al.* 2008).

3.3 Mecanismos de ação dos CNV

Apesar das variantes estruturais poderem ser benignas, podem também ter influências no fenótipo, pois podem aumentar a predisposição ou ser causadores de uma determinada doença, quando envolvem genes candidatos para certas patologias. Os CNV podem ser causadores de doença através de diversos mecanismos, como a modificação do número de cópias de um determinado gene, através de inserções ou deleções, a redução ou eliminação da expressão dum gene, por sobreposição desse mesmo gene ou por interação com elementos regulatórios, fazendo com que haja subexpressão ou sobreexpressão genética (Feuk et al., 2006).

Os CNV ocorrem em sequências genéticas com um ou vários genes e podem afetar a região codificante ou não codificante de um gene, o que se manifesta como uma alteração da sua dosagem e pode ou não ter uma influência no fenótipo. Além disso, os CNV podem também afetar elementos regulatórios importantes, o que pode alterar a expressão genética. No caso das doenças complexas, como estas são influenciadas por vários CNV, é provável que ocorram estes mecanismos de disrupção em conjunto e que todos contribuam para certas características fenotípicas do autismo, pois provocam a disrupção de várias regiões cromossômicas (Figura 8) (Feuk et al., 2006; Freeman et al., 2006; Toro et al., 2010).

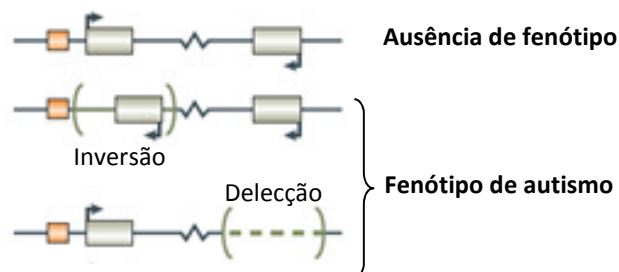


Figura 8. Influência dos CNV no fenótipo das PEA. Os CNV atuam em alelos de suscetibilidade, sobre uma combinação de vários fatores genéticos (adaptado de Feuk L et al., 2006).

3.4 Influência dos CNV na etiologia das PEA

Existem vários estudos que indicam a influência deste tipo de variantes estruturais no fenótipo das PEA, como o de Sebat et al. (2007), no qual foram identificados CNV que apareceram *de novo* em 3% das crianças autistas em famílias *multiplex* e em 10% em famílias *simplex*. Podem conter entre um único gene a regiões cromossômicas com vários genes, correspondendo 70% a deleções e 30% a duplicações. Nos vários estudos de pesquisa de CNV no autismo, foram identificados vários CNV que aumentam a susceptibilidade para esta doença, apesar de alguns dos resultados ainda não

terem sido replicados. Como se pode observar na figura seguinte, existe uma maior frequência de CNV nos cromossomas 5, 9, 12, 15 e 17 (Figura 9).

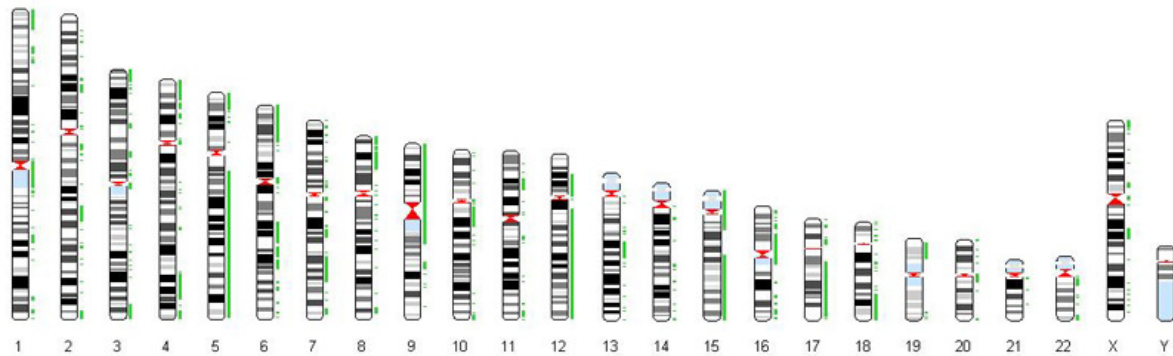


Figura 9. CNV relacionados com o autismo presentes em todos os cromossomas do genoma humano (as barras verdes representam os locais onde estão presentes CNV) (Adaptado de SFARI, 2012 – online [<https://gene.sfari.org/autdb/CNVHome.do>]).

Em vários estudos de CNV em indivíduos autistas, concluiu-se que a proporção de CNV *de novo* é maior em famílias simplex (7% a 10%) do que em multiplex (2% a 3%), sendo nos controlos cerca de 1%. Além disso, vários indivíduos com autismo têm ainda CNV *de novo* ou herdados em vários *loci* relacionados com doenças genómicas conhecidas ou outros genes relacionados com outras patologias, como a deficiência mental (Cook & Scherer, 2008). Num outro estudo realizado por Jacquemont *et al.* (2006) em casos de autismo síndromico, concluiu-se que 27% das famílias com PEA tinham vários CNV *de novo*.

Foram já identificadas várias variantes estruturais genómicas relacionadas com o autismo, como deleções raras dos genes *SHANK3*, *NLGN4X*, *PCDH10* e *NHE9*. Uma das regiões mais comuns identificada em vários estudos de autismo é uma microdeleção/microduplicação da banda 16p11.2, estando este CNV também relacionado com dismorfologias e deficiência mental. Outros CNV encontrados em casos de autismo, associados à função sináptica e neurotransmissão, incluem genes candidatos como *NRXN1*, *CNTN4*, *PARK2*, *GRIN2A*, *NCAM2*, *GRM8* e *RCAN1* (Cook & Scherer, 2008; Gai *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2008).

3.4.1 Disrupção do mecanismo sináptico e de certos neurotransmissores

Atualmente, pensa-se que alterações no mecanismo sináptico pode levar ao fenótipo de PEA, devido a várias razões, como o overlap que se observa a nível fenotípico entre o autismo, as síndromes do X frágil e de *Rett* (Zoghbi, 2003), visto que estes síndromes são provocados por mutações em repressores dos mecanismos de translação, no gene *FMR1*, no caso da síndrome do X

frágil e de transcrição, no gene *MEPC2*, no caso da síndrome de *Rett*. Isto pode fazer com que haja uma síntese proteica aberrante, o que pode ter alguma influência no autismo se esta regulação negativa da síntese proteica ocorrer nos neurónios e afetar certas proteínas que possam ter alguma influencia nas sinapses (Kelleher & Bear, 2008).

Existem dois tipos de sinapses, as elétricas, que consistem em junções GAP, permitindo a transferencia direta de corrente ionica entre os neuronios, através de conexinas e as químicas, cujo mecanismo é mediado por neurotransmissores e que compreendem a maioria das sinapses no SNC e sobre as quais há mais evidências de que possam estar afetadas no autismo (Figura 10) (Bear *et al.*, 2007).

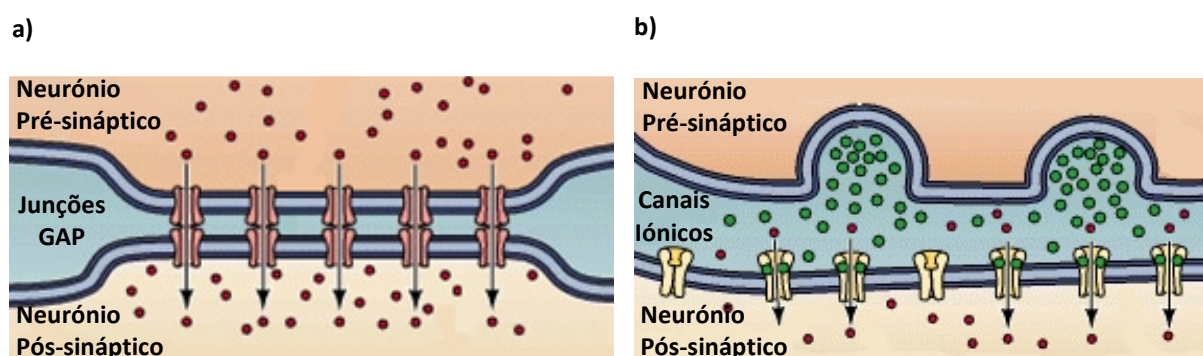


Figura 10. Tipos de sinapses do SNC **a)** Sinapse elétrica (os íões são transportados do neurónio pré-sináptico para o pós-sináptico, através de junções GAP; **b)** Sinapse química (os neurotransmissores passam por canais iónicos, do neurónio pré-sináptico para o pós-sináptico) (adaptado de Purves *et al.*, 2007).

Nas sinapses químicas, as quais ocorrem em maior número no SNC, entre as membranas pré e pós-sinápticas, existe uma matriz constituída por proteínas de adesão, que permitem que estas membranas estejam ligadas entre si. Durante o mecanismo de neurotransmissão, são libertados neurotransmissores, como o GABA ou glutamato, dos canais de cálcio, que permitem que haja uma comunicação entre os neuronios pré e pós sinápticos, pois ativam as proteínas recetoras presentes na célula pós-sináptica. Estes neurotransmissores afetam o neurónio pós-sináptico pela sua ligação a recetores específicos aì presentes, os quais podem ser transmitidos a outros canais iónicos, como os canais iónicos dependentes de neurotransmissores ou os recetores acoplados à proteína G (Bear *et al.*, 2007).

Qualquer tipo destes elementos que participam no mecanismo sináptico podem ser afetados por mutações, estando a disrupção de alguns deles implicada em casos de autismo. A partir da análise dos resultados de vários estudos genéticos das PEA, conclui-se que são importantes os CNV que provocam a disrupção de genes que codificam proteínas envolvidas em vários *pathways*. Estes genes podem ser importantes na etiologia do autismo, como aqueles que influenciam as interações

neuronal e o mecanismo sináptico e que incluem genes como o *NRXN*, *NLNG*, *CNTN3/4*, *CNTNAP2* e *SHANK3*, os que estão relacionados com a migração e crescimento neuronal, relacionados com os genes *LAMB1*, *EN2* ou com os receptores da tirosina cinase e os que englobam genes que regulam ou participam no mecanismo de neurotransmissão, como os receptores do glutamato e dos GABA (Freitag *et al.*, 2010).

II. OBJECTIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi a identificação de genes ou regiões de susceptibilidade para o autismo, com base no estudo de CNV.

1. Validação dos CNV identificados no rastreio genómico efetuado pelo AGP, como variantes raras e potencialmente patogénicas.
2. Identificação rigorosa dos pontos de quebra dos CNV.
3. Análise dos genes candidatos presentes e estabelecimento de uma relação entre o fenótipo clínico das crianças e os genes duplicados ou deletados.
4. Análise do padrão de transmissão dos CNV, nas famílias em que estes eram herdados e correlação com os traços autistas nos familiares.
5. Identificação de CNV patogénicos
6. Estudo dos potenciais mecanismos que poderão estar na base do fenótipo de autismo, com base nos genes presentes nos CNV.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Colheita de amostras e caracterização clínica dos pacientes

A escolha dos CNV foi realizada numa amostra populacional portuguesa inicial com 342 indivíduos, provenientes de Portugal Continental e Açores, sendo a maioria caucasianos. Estas amostras encontram-se sediadas no repositório português do autismo, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, estando organizadas em trios, constituídos pela criança com o fenótipo de uma das PEA e os seus pais. No rastreio populacional da duplicação na zona 9q21.13, foram usadas as amostras de casos de autismo, que não foram incluídas no GWAS realizado pelo AGP e populações controlo provenientes de vários pontos do país.

Os dados clínicos e amostras sanguíneas dos pacientes foram obtidos no decorrer de uma consulta realizada pela D^{ra} Guiomar Oliveira no Hospital Pediátrico de Coimbra, mediante obtenção de consentimento informado. Estes dados foram, posteriormente, enviados para o departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, sediado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), onde foi realizado o restante trabalho laboratorial e de investigação.

A colheita de sangue realizada no decorrer da consulta é feita em dois tipos diferentes de tubos, que são posteriormente enviados para o INSA. São usados tubos CPT (*Cell Preparation Tubes*), a partir dos quais é feito o isolamento de células e respectiva contagem (protocolo 1), para posterior extracção de RNA (protocolo 2) e tubos EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid Tubes*), de onde é feita a extracção de DNA (protocolo 3), sendo depois feita a sua quantificação, com recurso ao equipamento *Nanodrop (Thermo Scientific)*.

Depois, foi feita uma caracterização clínica do paciente com o uso de diversas ferramentas de diagnóstico, para avaliar o tipo de PEA que a criança tem, as quais serão descritas pormenorizadamente mais à frente.

2. Selecção dos CNV potencialmente significativos a nível etiológico

Numa fase inicial do trabalho, realizou-se uma selecção dos CNV raros e potencialmente patogénicos, para que fosse feita posteriormente a sua caracterização molecular e o estabelecimento de correlações com os dados clínicos nos indivíduos com PEA.

Recorreu-se à plataforma *Illumina 1M* para a genotipagem dos indivíduos portugueses, na qual foram usados mais de um milhão de SNP, estando alguns deles localizados em regiões onde estão presentes CNV, o que faz com que apareçam com um sinal alterado, permitindo a identificação

de deleções e duplicações. Com recurso aos *softwares* *iPattern* (IP), *QuantisNP* (QSNP) e *PennCNV* (PCNV), foram gerados algoritmos, que permitiram fazer a detecção destes CNV a partir dos *arrays* de genotipagem de SNP.

As informações acerca dos CNV estudados obtiveram-se com recurso à base de dados do *AGP CNV Database*. Nesta base de dados, fazem parte da população portuguesa 342 famílias simplex e multiplex com autismo e nela estão agrupados vários dados relativos aos CNV, como a sua frequência e taxas de recorrência em todo o grupo de crianças com autismo, o seu *overlap* com as bases de dados de controlos, o seu tamanho e conteúdo genético e a sua fiabilidade, tendo sido escolhidos para este estudo apenas os CNV que foram gerados por dois ou mais algoritmos.

O primeiro critério usado para a inclusão de certos CNV foi a sua percentagem de *overlap* com as bases de dados de controlos, a qual teve que ser inferior a 50%, para que os CNV fossem escolhidos para caracterização molecular. As bases de dados de controlo usadas foram a *SAGE_1M*, a *HM_1M*, a *OHI*, a *PopGen* e a *CHOP*, sendo estas consituídas por indivíduos saudáveis.

O tamanho dos CNV foi também considerado importante, sendo dada mais importância aos CNV com um maior tamanho, pois contem um maior número de genes, apresentando uma maior probabilidade de ter genes de susceptibilidade, que possam levar a um risco acrescido de autismo. Foram ainda estudados dois CNV de menor tamanho, que foram considerados importantes devido ao conteúdo génico.

Outro dos critérios de escolha relevante foi o conteúdo génico dos CNV, seleccionando-se aqueles com genes com funções importantes no sistema nervoso central e/ou que já foram previamente implicados no autismo ou outras perturbações do neurodesenvolvimento. Para obter todas estas informações recorreu-se a vários *browsers* informáticos, como o OMIM (online - [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>]), o Genecards (online - [<http://www.genecards.org/>]) e o GeneSfari (online - [<https://gene.sfari.org/autdb/Welcome.do>]).

3. Controlo de qualidade das amostras de DNA e dos primers

Antes de se iniciar o trabalho laboratorial, fez-se um controlo de qualidade das amostras de ADN, sendo feita a quantificação das soluções *stock*, além de se verificar se havia algum tipo de contaminação das amostras. Com recurso ao equipamento *Nanodrop 2000*, foram obtidos os valores de quantificação das amostras e da razão 260/280, que permite verificar se as amostras estão contaminadas. Esta razão baseia-se em medidas de absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm e é usada para verificar qual a pureza das amostras. Normalmente, uma razão próxima de 1,8 significa que a amostra de DNA que está a ser testada é relativamente pura e se esta razão for

inferior a este valor, pode indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes (Nanodrop, 2007).

As amostras foram ainda submetidas a electroforese em gel de agarose (1%), durante 30 minutos, para verificar a qualidade do DNA e assegurar que este não se encontrava degradado, sendo os resultados observados com recurso à radiação ultravioleta. Depois, foi feita a diluição das soluções stock de DNA para as soluções de trabalho usadas em laboratório, cuja concentração deve ser de 25 ng/ μ l, usando-se como solvente água bidestilada ou *TE (Tris-EDTA)*.

No que diz respeito aos primers, estes foram desenhados de acordo com parametros específicos, entre os quais, o número de bases que contém (20 a 30 pb), a temperatura de *melting* (58°C a 60°C) que deve ser relativamente próxima entre o par de primers e o conteúdo de guaninas e citosinas (40% a 60%).

4. Descrição geral da técnica de PCR

Recorreu-se ao *browser* genómico da USCS (*University of California Santa Cruz*) (online - [<http://genome.ucsc.edu>]), onde está a base de dados do genoma humano *NCBI36/hg18*, a partir da qual foram obtidas, com recurso à ferramenta DNA, as sequências genéticas necessárias para desenhar os primers usados para a validação dos CNV e sequenciação dos ponto de quebras. Depois realizou-se uma caracterização molecular dos CNV raros, na qual foi feita a sua validação nos indivíduos com PEA e nos pais pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e a sequenciação dos *ponto de quebras* de cada um, através da técnica de PCR, com recurso a *primers* específicos, para amplificação e sequenciação do DNA, procedimentos que estão descritos nos capítulos seguintes.

No decorrer da reação de PCR, em geral ocorre uma desnaturação inicial do DNA, a 94°C/95°C, que provoca a separação das cadeias DNA, seguida de um processo cíclico, constituído por um número variável de repetições, consoante o tipo de PCR e de uma extensão final a 68°C-72°C. Durante o processo cíclico, primeiro existe uma nova desnaturação das cadeias a 94°C/95°C, seguida do annealing dos primers, cuja temperatura depende da temperatura de melting dos primers. Em relação ao tempo de extensão, este é tanto maior quanto maior for o tamanho da sequência que se pretende amplificar (Figura 11).

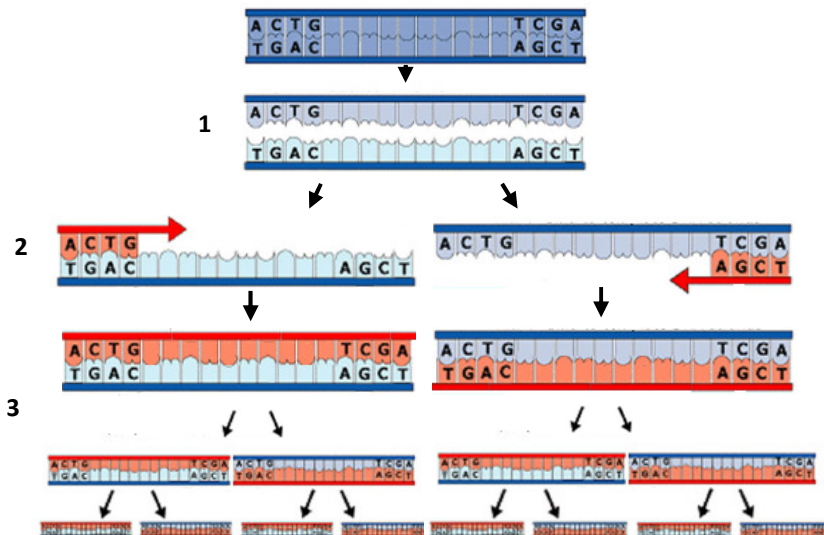


Figura 11. Princípios da reação de PCR. **1.** Desnaturação das cadeias de DNA para provocar a sua separação; **2.** *Annealing* dos primers nas cadeias genéticas; **3.** Extensão das cadeias de DNA.

5. Validação dos CNV

Os CNV foram submetidos a um processo de validação, para verificar se de facto as deleções e as duplicações estavam presentes e confirmar a sua heritabilidade. Nesta fase usou-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (*Quantitative Real Time PCR*, qPCR), com recurso ao equipamento *Light Cycler® 480 (Roche)*, o qual permite fazer uma detecção quantitativa das sequências de ácidos nucleicos. O procedimento seguido em laboratório para validar os CNV encontra-se representado na figura seguinte (Figura 12).

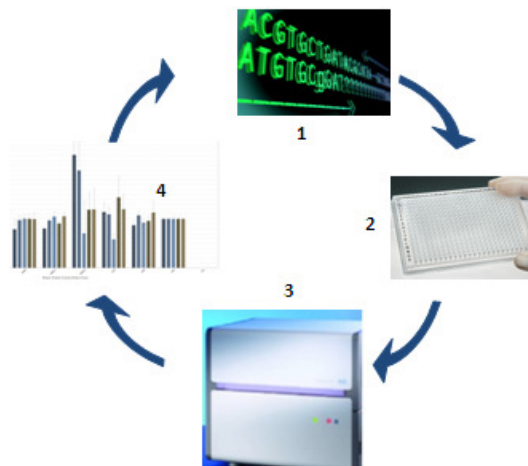


Figura 12. Procedimento seguido em laboratório para validação dos CNV. **1.** Desenho dos *primers* com as respectivas sondas no *browser probe finder*; **2.** Preparação placa com as amostras de DNA e a *mix*; **3.** Amplificação e quantificação absoluta dos fragmentos de DNA pela técnica de qPCR no *LightCycler*; **4.** Análise dos resultados com recurso ao *software QBase*.

5.1 Desenho dos *primers* no *browser Probe Finder*

O *probe finder v.2.47 (Roche)* foi um dos *browsers* utilizados para desenhar os *primers* necessários para a validação dos CNV. Desenharam-se dois ensaios para cada CNV, sendo cada um composto por um par de *primers*, como se apresenta na figura seguinte (Figura 13).

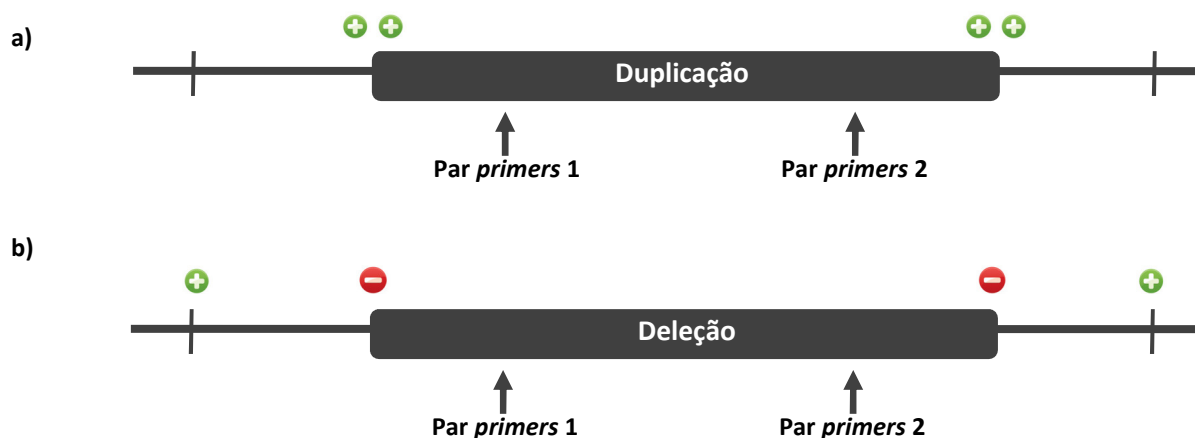


Figura 13. Esquema do desenho dos *primers* para validação dos CNV. **a)** Duplicação (+ - SNP com sinal normal; + + - SNP com sinal duplicado); **b)** Deleção (+ - SNP com sinal normal; - - SNP com sinal delectado).

Tanto nas duplicações como nas deleções, os ensaios desenharam-se no interior do CNV, ou seja, dentro dos SNP com sinal alterado e cada um deles dá origem a um produto de PCR com um tamanho próximo de 100 pares de bases, que depois vai ser quantificado no equipamento *Light Cycler*. Depois de serem desenhados, verificou-se se cada um destes pares de *primers* era específico para a zona do genoma que se pretendia amplificar, o que foi feito com recurso às ferramentas *BLAST* e *IN SILICO PCR* do *browser* genómico da USCS.

Na tabela seguinte estão representadas as principais características dos ensaios de validação dos CNV estudados (Tabela 3).

Tabela 3. Primers usados para a validação dos CNV estudados.

CNV	Probando	Ensaio	Sonda	Primers	Tamanho produto PCR (pares de bases)
3p22.1 3p22.2	Individuo 1	SCN5A	23	5'-ATGTGGGAGCTACAGGAGGA-3' (F) 5'-ATCACCCCTGATTGGGTGTTTC-3' (R)	60
		XIRP	14	5'-TGGAAAGTCAGGTCCTGTAC-3' (F) 5'-CCCATAATGCCTTTGTTCCCTC-3' (R)	65
9q31.1	Individuo 3	CYLC2	7	5'-TGCCCTTACTTTACCACTGC-3' (F) 5'-CCTGGAACACAATCAAATCAGA-3' (R)	74
		GRIN3A	49	5'-TCACAAGGAAACAAAGGTCAAC-3' (F) 5'-GCTCTATCATGGCTGAGAAGG-3' (R)	74
11q	Individuo 4	GRM5	2	5'-AGGCCATTTCTCCTTGTGGT-3' (F) 5'-ATGAATGAATCTTGTGGTGACG-3' (R)	60
	Individuo 5	INTREG	65	5'-GACAGCCAATGTGGTGACAG-3' (F) 5'-TGGGTGCATATGAGCACAGT-3' (R)	80
16p13.11 16p13.12	Individuo 6	ABCC1	17	5'-ACCCTTGTGCTTTGCTTCTC-3' (F) 5'-CCTGCTGATGTCCCACTAT-3' (R)	66
		NTNA1	43	5'-GGAATTCAGGGACTGGATCA-3' (F) 5'-TGCAATTTAAAAGCATACAGTGC-3' (R)	80
16p13.11 16p13.12	Individuo 7	KIAA	48	5'-TAATTGGGCTGCAATTCGT-3' (F) 5'-TCTCCTACCCAGCAGTCAGG-3' (R)	86
		PDXDC1	2	5'-GTCCTCCCAGGGACCTTAAA-3' (F) 5'-GGATCTAGTCCAGGGATTTCC-3' (R)	60
20p13	Individuo 8	TGM3	14	5'-TACACAATGGCCCTCCAGAT-3' (F) 5'-GCCAGGGGTTAAAAAGCAGT-3' (R)	85
		ZNF343	2	5'-CATAAGCCCAGGAAGATCTGAA-3' (F) 5'-CACTTGTTCCTCCTGCCTTC-3' (R)	81

5.2 PCR quantitativo em tempo real

No mecanismo do qPCR acumulam-se produtos de PCR que são quantificados em tempo real, o que resulta numa curva de amplificação sigmoideal. Este tipo de PCR foi escolhido devido às suas diversas vantagens, a saber, baixo custo, rápido desenvolvimento do ensaio e elevada sensibilidade. Para medir a acumulação dos produtos de PCR usam-se sondas de hibridação indicadas para cada par de *primers*, as quais são fluorescentes, uma na zona 3' (*Oligo 1*) e a outra na zona 5' (*Oligo 2*). No decorrer do processo de amplificação, os *primers* hibridam na sequência devida, aproximando os fluoróforos entre si, o que provoca uma emissão de energia e permite que seja detectado e quantificado o produto obtido (Figura 14) (D'haene *et al.*, 2010; Vanguilder *et al.*, 2008).

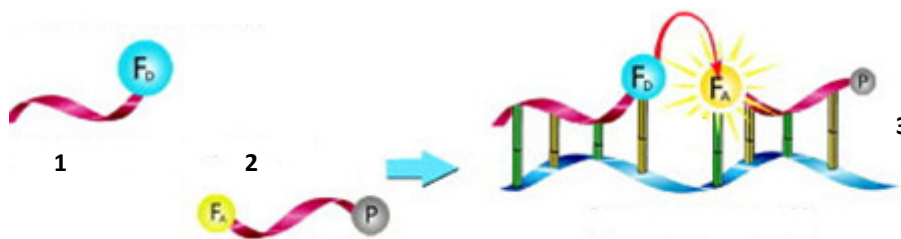


Figura 14. Mecanismo de medição da acumulação dos produtos de PCR durante o qPCR. (1. Sonda *oligo 1*, com um fluoróforo dador na região 3' (F_D); 2. Sonda *oligo 2*, com um fluoróforo aceitador na região 5' (F_A); 3. Produto amplificado) (adaptado de Sigma-Aldrich, 2012 – online [<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/fluorescent-probes/lightcycler-probes1.html>]).

No laboratório, pipetaram-se as amostras de DNA em triplicado dos três membros da família para placas 384, tendo estas que apresentar a concentração de 25 ng/ μ l. As amostras são pipetadas três vezes para que haja replicados e se possa ver qual a fiabilidade do método e dos resultados obtidos. São também pipetados três controlos em triplicado, para comparar estes resultados com a quantificação das amostras de DNA da família que se pretende validar. Os controlos consistem em indivíduos que não possuem deleções nem duplicações na zona dos CNV que estão a ser validados. Depois, é preparada uma *mix*, com reagentes provenientes do *kit* da Roche *LightCycler*® 480 *Probes Master*, segundo proporções previamente definidas. Esta *mix* é adicionada à amostra de DNA e a placa, depois de centrifugada, é colocada no *LightCycler 480*, seguindo-se um protocolo definido para amplificação e quantificação das amostras de DNA. As características da *mix* e do programa de PCR usados estão representadas nas tabelas seguintes (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. *Mix* usada para as validações dos CNV por qPCR adicionada a cada uma das amostras.

<i>Mix</i>	Quantidades
Par de <i>primers</i> 1	0,4
Par de <i>primers</i> 2	0,4
Sonda UPL	0,1
<i>MasterMix</i>	5
H ₂ O	2,1
Volume <i>mix</i>	8
DNA	2
Volume total	10

Tabela 5. Protocolo usado para a quantificação absoluta do DNA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
Pré-incubação	95	10'	1
Desnaturação	95	10''	} 45
<i>Annealing</i>	60	30''	
Extensão	72	1''	
Arrefecimento	40	30''	1

5.3 Análise de resultados no QBase

A análise dos resultados realiza-se com recurso ao programa *Biogazelle QBase plus*, sendo estes apresentados sob a forma de um gráfico, que permite concluir se as deleções ou duplicações estão presentes, por comparação com os controlos. Neste caso, a quantificação de uma amostra na qual o CNV não está presente é próxima da unidade e quando se verifica a presença do CNV é próxima de 2 para as duplicações e próxima de 0,5 para as deleções, ou segundo estas proporções.

6. Determinação dos pontos de quebra dos CNV

Quando o CNV é validado como estando presente, o procedimento seguinte é o mapeamento dos pontos de quebra, para uma melhor avaliação das delimitações das deleções e duplicações e para verificar se estes produzem algum tipo de desregulação genética. Nesta fase, foi usado o método de PCR de longa cadeia (*Long Range PCR*, LR-PCR), visto que as sequências a amplificar tinham um tamanho grande, na maioria dos casos superior a 5 kb. No trabalho laboratorial, foram realizados diversos procedimentos de uma forma sequencial, como se pode observar na figura seguinte (Figura 15).

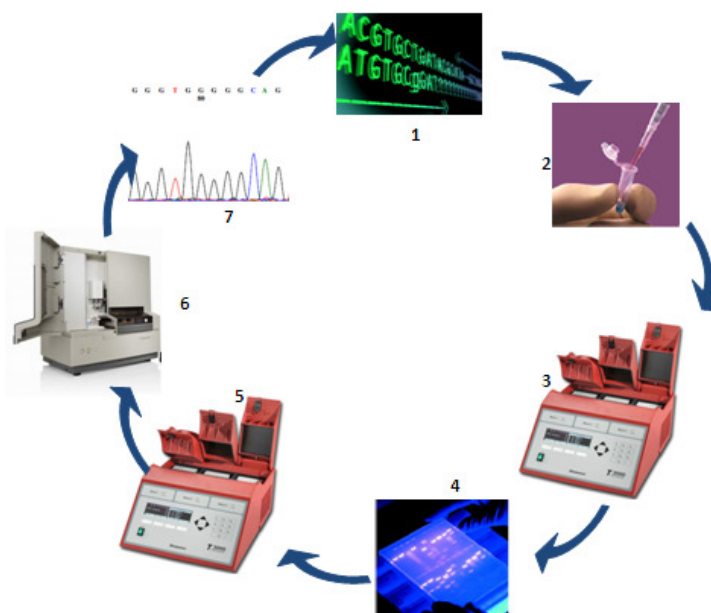


Figura 15. Procedimentos realizados em laboratório para sequenciação dos pontos de quebras dos CNV. **1.** Desenho dos *primers* no *browser primer 3*; **2.** Preparação das amostras de DNA e adição da *mix* de amplificação; **3.** Amplificação dos fragmentos pela técnica de PCR; **4.** Observação dos resultados da amplificação em gel de agarose com recurso à radiação ultravioleta; **5.** Purificação e sequenciação dos produtos de PCR; **6.** Análise dos fragmentos de DNA no sequenciador automático; **7.** Observação das sequências com recurso ao *software bioedit*.

6.1 Desenho dos *primers* no *browser Primer 3*

O *primer 3* (Whitehead Institute, Cambridge, MA) é outro tipo de *software* usado para desenhar os *primers*, que foram utilizados para a sequenciação dos pontos de quebra dos CNV. O mecanismo é um pouco diferente do anterior e varia no caso de se tratarem de deleções ou duplicações. No caso das duplicações (Figura 16a), os *primers* foram desenhados no interior do CNV, sendo o *primer forward* desenhado antes do último SNP duplicado e o *primer reverse* depois do primeiro SNP duplicado. O objetivo deste *design* é fazer com que seja amplificada as sequências próximas de cada um dos blocos da duplicação, para obter os pontos de quebra proximais e distais exatos do CNV. Quando se pretende estudar os pontos de quebra das deleções (Figura 16b), os *primers* começam por ser desenhados no exterior do CNV, ou seja, os *primers forward* antes do último SNP com sinal normal e os *primers reverse* depois do primeiro SNP com sinal normal. Neste caso, pretende-se que sejam amplificadas as sequências que mediam o CNV, o que permite que se obtenham os pontos de quebra proximal e distal do CNV.

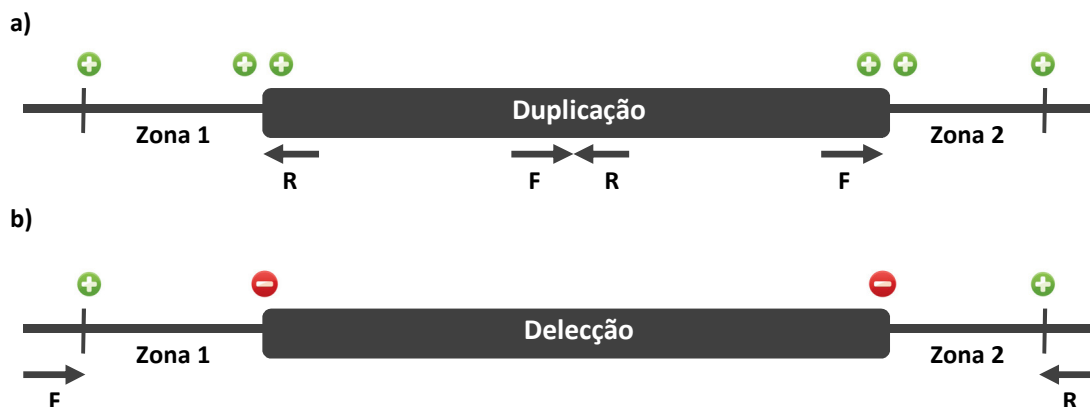


Figura 16. Esquema do desenho dos *primers* para sequenciação dos pontos de quebra **a)** Duplicação (+ - SNP com sinal normal; + + - SNP duplicado); **b)** Deleção (+ - SNP com sinal normal; - - SNP deletado).

Em ambos os casos, quando a banda amplificada pelo par de *primers* inicial tinha um tamanho muito grande e não permitia a obtenção da sequência dos pontos de quebra, recorreu-se à metodologia de *primer-walking* ao longo das zonas 1 e 2 até se obter os resultados pretendidos. Esta metodologia baseia-se no desenho de vários *primers* ao longo das sequências que contém a localização possível dos pontos de quebra, até se encontrar o local onde se inicia e termina o CNV. Neste caso, também se verificou se os *primers* hibridavam no local pretendido e se eram específicos para a zona a amplificar, o que também foi feito com recurso às ferramentas *BLAST* e *IN SILICO PCR* do *browser* genómico da USCS.

Na tabela seguinte estão representadas as principais características dos *primers* que, depois do processo de otimização dos PCR, permitiram que fossem obtidas as sequências dos pontos de quebra dos CNV (Tabela 6).

Tabela 6. *Primers* usados para amplificação e sequenciação dos pontos de quebra dos CNV estudados.

CNV	<i>Primers</i>	Squências dos <i>primers</i>	Tamanho do produto de PCR (pb)
9q21.13		Amplificação PCR normal:	1000
	ANXA1_1	5'-CCGATAGCTGTGAGGCATTT-3' (F)	
	ANXA1_4	5'-ACAGTCACAACCTCCATCAGG-3' (R)	
	ANXA1_1	Sequenciação: 5'-CCGATAGCTGTGAGGCATTT-3' (F)	
20p13		Amplificação LR-PCR:	10000
	CHR20_F1	5'-AACACCACCAGACGAAGGTC-3' (F)	
	CHR20_R1	5'-TCTTCACAAGTGCCATCGAG-3' (R)	
	CHR20_F7	Sequenciação: 5'-CCCAGGAATTTGTGGAGAAG-3' (F)	
9q31.1		Amplificação LR-PCR:	8500
	CHR9_F2	5'-AACCCACTGGAGTGAGTTGG-3' (F)	
	CHR9_R2	5'-AACAAGCTCCAGGCTTTCA-3' (R)	
		Amplificação Nested PCR:	1000
	CHR9_F5	5'-GCTGAAAGAAAAGGGCTGTG-3' (F)	
	CHR9_R3	5'-CTTTGAGGAGGCAAAGCAC-3' (R)	
	CHR9_F5	Sequenciação: 5'-GCTGAAAGAAAAGGGCTGTG-3' (F)	

6.2 Long Range PCR

Para fazer a sequenciação dos pontos de quebra dos CNV que foram validados, usou-se a técnica de *Long-Range* PCR, que permite fazer a amplificação de fragmentos com um tamanho até 15 Kb (quilobases). Para isso, utilizou-se o *kit SequalPrep Long PCR kit (Invitrogen)*, constituído pela enzima *SequalPrep™ Long Polymerase*, 5 U/μl, pelo *buffer SequalPrep™ 10X Reaction Buffer*, pelos iniciadores *SequalPrep™ 10X Enhancer A e B* e pelo adjuvante *DMSO*. Foram adicionados 18 μl de uma *mix* com estes componentes a 2 μl de DNA, perfazendo um volume final de 20 μl. No decorrer da reação de LR-PCR, a desnaturação cíclica é feita ao longo de 10 mais 25 ciclos e o tempo de extensão corresponde, geralmente, a um minuto por kb. As características da *mix* e do programa de PCR usados estão descritas nas tabelas seguintes (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. *Mix* usada para amplificação fragmentos amplificados por LR-PCR.

Reagentes	Volume na reacção
<i>Buffer</i>	2
<i>Enhancer A ou B</i>	1
<i>Primer F</i>	0,75
<i>Primer R</i>	0,75
DMSO	0,4
TAQ	0,36
Água	12,74
<i>Mix</i>	18
DNA	2
Total	20

Tabela 8. Programa de amplificação das amostras de DNA pela técnica de LR-PCR.

Etapa	Deleção na banda 9q31.1		Duplicação na banda 20p13		Repetições
	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação inicial	94	2'	94	2'	1
Desnaturação cíclica	94	10''	94	10''	10
<i>Annealing</i>	54°C	30''	57°C	30''	
Extensão	68	12'	68	10'	
Desnaturação cíclica	94	10''	94	10''	25
<i>Annealing</i>	54°C	30''	57°C	30''	
Extensão	68	12' (+20'')	68	10' (+20'')	
Extensão final	72	5'	72	5'	1

6.3 PCR normal

Esta técnica foi usada no rastreio populacional da duplicação na banda 9q21.13, pois o produto de PCR obtido tinha um tamanho reduzido em casos e controlos. Os procedimentos são equiparados aos da técnica de LR-PCR, mas o *kit* usado é diferente. Recorreu-se ao *kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (promega)*, constituído pelo *buffer 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer*, a solução de magnésio *Magnesium Chloride Solution (25 mM)* e pela enzima *GoTaq® DNA Polymerase (5 U/μl)*. Foi adicionada uma *mix* de 9 μl composta por estes reagentes, *DNTPs* e água a 1 μl de DNA, sendo o volume final 10 μl. Durante a reacção de PCR, o processo de desnaturação cíclica decorreu entre 25 a 30 ciclos, estando a *mix* e o programa de PCR usados descritos nas tabelas seguintes (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. *Mix* usada para amplificação dos fragmentos de DNA, amplificados por PCR normal.

Reagentes	Volume na reacção
<i>Buffer</i>	2
<i>DNTPs</i>	0,75
<i>Primer F</i>	0,4
<i>Primer R</i>	0,4
Magnésio	0,75
goTAQ	0,05
Água	4,65
<i>Mix</i>	9
DNA	1
Total	10

Tabela 10. Programa de amplificação dos fragmentos de DNA por PCR normal.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	95	5'	1
Desnaturação cíclica	94	30''	} 30
<i>Annealing</i>	60	30''	
Extensão	72	1'	
Extensão final	72	5'	1

6.4 Nested PCR

No caso dos CNV cujo processo de amplificação se tornou mais complicado de otimizar, foi usada a técnica de *Nested PCR*, na qual as amostras são submetidas a duas reações de PCR, para que a sequência amplificada esteja mais purificada. Esta técnica consiste em picar as bandas observadas no gel de agarose, de forma que seja obtido DNA suficiente para fazer nova amplificação. Este é, de seguida, misturado na *mix*, podendo, quando é possível, ser usados primers diferentes dos usados no primeiro PCR.

6.5 Observação dos resultados em gel de agarose

As amostras são corridas em gel de agarose e a estas é adicionado o corante *Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega)* que acompanha a migração das moléculas de DNA durante a eletroforese no gel de agarose. É ainda colocado no gel o *ladder (Promega)* que permite ver qual o tamanho dos fragmentos, visto que este é composto por diversas bandas com tamanhos pré-definidos e cuja migração acompanha a migração dos produtos de PCR, o que permite concluir qual o seu tamanho.

A preparação do gel de agarose consiste na diluição da agarose (*Fermentas*) num solvente designado *buffer Tris-Borate-EDTA (TBE) (Fermentas)*, tendo que se adicionar o agente intercalante *Syber Safe in DMSO (Invitrogen)*, o qual permite que as bandas se tornem visíveis quando são submetidas à radiação ultravioleta. No decorrer do trabalho. Foram usados géis com concentrações compreendidas entre 0,8% e 1,5%, consoante os fragmentos que se pretendia observar tinham um tamanho maior ou menor, respectivamente.

A tina de eletroforese utilizada foi a *Sub-Cell 192 (Bio-Rad)*, e recorreu-se ao sistema de alimentação de alta voltagem *Power Pac 1000 (Bio-Rad)*, o qual foi regulado para uma voltagem de 80 a 100 voltes. Depois, fez-se a confirmação dos resultados no equipamento *Safe Imager™ (Invitrogen)*, que é um transiluminador de luz azul que permite observar as bandas no gel de agarose, por emissão de radiação ultravioleta. Foi ainda tirada uma foto do gel, com recurso à máquina fotográfica *Coolpix 100D (Nikon)*, para que os resultados pudessem ficar arquivados.

6.6 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Antes de sequenciar os fragmentos, foi realizada uma purificação dos produtos de PCR, com o reagente *ExoSap* (*Fermentas*), o qual consiste numa combinação de uma exonuclease e de uma fosfatase alcalina e é usado para retirar os nucleótidos e *primers* em excesso. De uma maneira geral, adicionaram-se 2 µl de *Exosap* a 6 µl de produto de PCR, perfazendo um volume final de 8 µl, sendo esta mistura submetida ao programa de PCR descrito na tabela seguinte (Tabela 11).

Tabela 11. Programa usado para purificação das amostras com *Exosap*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
1ª Parte	37	15'
2ª Parte	80	15'

Antes da sequência das amostras ser lida no sequenciador automático *ABI 3130XL* (*Applied Biosystems*), é ainda realizado um mecanismo sequenciação das mesmas, em que é usado apenas um dos *primers* (*Forward* ou *Reverse*), água e *Big Dye Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*), que é um conjunto de corantes altamente sensíveis, que permitem que se faça a leitura das sequências (Rosenblum BB *et al.*, 1997). As proporções com que são adicionados estes componentes ao produto de PCR purificado e o programa de PCR usado estão descritas nas tabelas seguintes (Tabela 12 e 13).

Tabela 12. *Mix* usada para sequenciação das amostras previamente purificadas.

Reagentes	Volume na reação
Produto de PCR purificado	1
<i>Primer</i>	1
<i>BigDye</i>	1
Água	7
Total	10

Tabela 13. Programa usado para sequenciação das amostras, para que os resultados sejam lidos com recurso ao sequenciador automático.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
Desnaturação cíclica	96	10''	
<i>Annealing</i>	58°C	5''	30
Extensão	60	4'	

6.6.1 Análise dos resultados no *BioEdit*

Os resultados foram analisados no *software BioEdit*, no qual são obtidas as sequências da zona do CNV que se amplificou. Depois, recorre-se novamente ao *browser* informático da UCSC, onde é feito um *BLAST* das sequências obtidas no genoma humano, para se verificar qual a zona exata que foi amplificada e se nos resultados já estão presentes as sequências dos pontos de quebra.

7. Correlação com o fenótipo clínico e segregação em famílias

Nesta fase do trabalho, foi analisada a base de dados do BCGENE que contem informações sobre os dados clínicos e fenotípicos das crianças com autismo, cujos CNV foram estudados geneticamente e de alguns dos seus familiares, geralmente o pai e a mãe. Depois de analisados estes dados, foi possível fazer uma relação entre eles e as características dos CNV estudados e foi realizada ainda uma comparação entre os CNV *de novo* e os herdados, sendo que nestes últimos será feita uma relação com as características de sociabilidade e linguagem dos pais, para verificar se estes também apresentam algum traço autista.

Para as crianças com o fenótipo autista, foram primeiro analisadas as ferramentas de diagnóstico correspondentes à Entrevista de Diagnóstico de Autismo revista (*Autism Diagnostic Interview - Revised, ADI-R*), que é um questionário realizado aos pais cujo principal objetivo é avaliar as capacidades de comunicação e social e os comportamentos restritos, repetitivos e estereotipados (Lord *et al.*, 1994) e a Escala de Diagnóstico de Observação de Autismo e Perturbações do Espectro do Autismo (*Autism Diagnostic Observation Schedule, ADOS*), que é uma escala de avaliação dos indivíduos que se suspeita que tenham alguma PEA e que permite avaliar a sua interação social, comunicação e capacidade imaginativa (Lord *et al.*, 2000).

De seguida, analisou-se os resultados dos testes de Quociente de Inteligência (QI), com recurso à escala II de *Ruth Griffiths* de desenvolvimento mental (*Ruth Griffiths Mental Scale II, GRIFFITHS*) ou à escala de inteligência de *Weschler para crianças* (*Wechsler Intelligence Scale for children, WISC*). Ambas permitem fazer uma avaliação da capacidade mental das crianças, para verificar se elas apresentam um caso de autismo associado ou não a algum tipo de atraso mental.

Analisaram-se ainda os dados obtidos na análise dos resultados dos testes PSP-Q e SRS. Ambos consistem em questionários realizados aos pais, sendo que o *BAPQ* permite avaliar as características da sua personalidade e linguagem (Hurley *et al.*, 2007) e o *SRS* baseia-se na capacidade de interação social e quanto mais elevado é o seu resultado, mais severas são as incapacidades sociais (Constantino *et al.*, 2003). O resultado do teste PSP-Q considera-se significativo quando o seu valor é superior a 3,15 e no caso do SRS, um resultado compreendido entre 60 e 80 indica incapacidades sociais médias a moderadas, sendo que um resultado superior a 80 indica que estas incapacidades são severas.

IV. RESULTADOS

1. Escolha de CNV etiologicamente significativos

Todos os CNV estudados foram escolhidos de acordo com critérios específicos, que revelam o seu interesse etiológico para as PEA. Depois de se verificar a sua ausência em controlos e de se escolherem os CNV que apresentavam um maior tamanho, os quais são mais frequentemente patogénicos, foi tido em consideração o conteúdo genético dos CNV, tendo sido dado especial ênfase aos genes previamente descritos na literatura como importantes para a etiologia das PEA e na expressão destes genes no cérebro ou SNC. Na tabela seguinte é apresentado um resumo das funções destes genes, nos quais se baseou a escolha dos CNV estudados (Tabela 14).

Tabela 14. Funções dos genes, presentes nos CNV estudados, que têm interesse etiológico para as PEA (¹online - [<http://www.genecards.org/>]; ²online - [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>]).

CNV	Funções dos genes etiologicamente interessantes
Duplicação 3p22.1 3p22.2	SLC25A38: Participa no transporte da glicina ao longo da membrana mitocondrial (Genecards, 2012) ¹ . CX3CR1: Recetor que media funções adesivas e migratórias (Genecards, 2012) ¹ . WDR48: Regulador dos complexos de desubiquitinação (Genecards, 2012) ¹ . SCN10A/11A: Proteínas integrais que mediam a permeabilidade membranar (Genecards, 2012) ¹ : <ul style="list-style-type: none">• SCN10A: Codifica um canal resistente à tetrodotoxina (Rabert <i>et al.</i>, 1998).• SCN11A: Media especificamente o fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>, BDNF) na despolarização da membrana neuronal (Blum <i>et al.</i>, 2002). MOBP: Participa na compactação e estabilização das folhas de mielina (Genecards, 2012) ¹ .
Duplicação 9q21.13	ANXA1: Inibe a fosfolipase A2, participa na biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, promove a fusão membranar e está envolvida na excitose (Genecards, 2012) ¹ .
Deleção 9q31.1	SLC44A1: É um transportador de colina e está envolvido na produção de mielina (Genecards, 2012) ¹ . SMC2: Participa na reparação de DNA nos mamíferos (NCBI, 2012) ² . GRIN3A: Recetor do glutamato presente no SNC (Andersson <i>et al.</i> , 2001), sendo importante para a transmissão sináptica excitatória e plasticidade do SNC (Genecards, 2012) ¹ .
Deleção 11q14.3	GRM5: Recetores metabotrópicos de glutamato, que ativam a fosfolipase C (Minakami <i>et al.</i> , 1994) e tem uma ação geralmente excitatória (Genecards, 2012) ¹ .
Deleção 16p13.11 16p13.12	NDE1: Necessário para a formação do fuso mitótico, duplicação dos centrossomas e desenvolvimento do córtex cerebral e regula a produção de neurónios e a plasticidade sináptica (Genecards, 2012) ¹ . NTNA1: Útil para o <i>turnover</i> de proteínas intracelulares do complexo dependente da ubiquitina (Genecards, 2012) ¹ .
Duplicação 20p13	PDYN: Precursor de vários neuropéptidos opióides (Horikawa <i>et al.</i> , 1983), tem um papel importante em várias funções fisiológicas (Genecards, 2012) ¹ . SIRPA: Substrato dos recetores da tirosina cinase, regula o crescimento de vários tipos celulares (NCBI, 2012) ² , suporta a adesão dos neurónios cerebrais, crescimento das neurites e aderência das células gliais. É importante para a sinalização intracelular durante a sinaptogénese (Genecards, 2012) ¹ . TGM6: Catalisa a ligação de proteínas e a conjugação das poliaminas às proteínas (Genecards, 2012) ¹ .

A duplicação presente no cromossoma 3 contém vários genes, que parecem ser importantes para a etiologia do autismo, principalmente, devido à sua expressão no sistema nervoso central e cérebro. Analisando vários estudos de expressão realizados em modelos animais, concluiu-se que o *SLC25A38* se expressa em tecidos do sistema nervoso central (Haitina *et al.*, 2006), o *WDR48* no cérebro (Nagase *et al.*, 2000), o *CX3CR1* no tecido neural (Raport *et al.*, 1995); o *SCN11A* em neurónios sensoriais (Dib-Hajj *et al.*, 1998), o *SCN10A* no SNC periférico (Rabert *et al.*, 1998) e o *MOBP* na medula espinal, mais especificamente na mielina dos oligodendrócitos (Yamamoto *et al.*, 1994).

Em relação à deleção presente no cromossoma 9, a sua relevância deve-se à eliminação de alguns genes importantes no SNC. Em modelos animais, observou-se a expressão do gene *SLC44A1* na medula espinal e cérebro (O'Regan *et al.*, 2000) e do gene *GRIN3A* nos neurónios do SNC (Andersson *et al.*, 2001). Além disso, o gene *SMC2* intervém em processos de reparação do DNA (NCBI, 2012 – online [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>]).

No caso das duas deleções presentes no cromossoma 16, a sua escolha deveu-se ao facto das bandas cromossómicas afetadas pelo CNV já terem sido previamente identificadas em outros indivíduos com autismo e consideradas importantes para esta patologia em estudos como o de Ullmann *et al.* (2007) e Hannes *et al.* (2009), onde é citado que variantes genómicas na banda 16p13.11 aumentam a predisposição dos indivíduos para o autismo e atraso mental. Além disso, também contém genes que parecem ser importantes para a etiologia das PEA, como o *NDE1* que se apresenta expresso no cérebro (Yan *et al.*, 2003) e no neuroepitélio apical (Bakircioglu *et al.*, 2011) e o *NTNA1*, que está implicado no comportamento social, aprendizagem e memória (Kwon *et al.*, 2000).

No que diz respeito à duplicação presente no cromossoma 20, esta foi escolhida por conter o gene *SIRPA*, que apresenta uma elevada expressão no cérebro (Yamao *et al.*, 1997). Neste CNV estão também presentes outros genes relacionados com outras doenças que afetam as funções neurológicas, como o *PDYN* e *TGM6*, que quando se encontram mutados contribuem para o desenvolvimento da ataxia espinocerebral, que é uma doença neurodegenerativa progressiva, com sintomas como ataxia, tremores, neuropatia sensorial e atraso cognitivo (Bakalkin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Apesar de apresentar um tamanho inferior às restantes, escolheu-se também a deleção presente no cromossoma 11, pois já foi previamente identificada na literatura por Iossifov *et al.* (2012) e Kelleher *et al.* (2012), como contribuindo para a etiologia das PEA.

No que concerne a duplicação existente no cromossoma 9, um dos critérios de escolha foi a sua presença em vários indivíduos da população portuguesa e também em outras populações, e ausência em controlos. Além disso, conforme já foi citado na literatura, o gene contido nesta

duplicação, *ANXA 1*, poderia ser importante na etiologia do autismo, devido a ser expresso no SNC (Hamre *et al.*, 1995) e à sua principal função, a inibição da fosfolipase A2 (Genecards, 2012 – online [<http://www.genecards.org/>]).

Depois de serem tidos em conta todos os critérios de seleção dos CNV, escolheram-se sete que pareciam ter uma maior relevância etiológica para o autismo, dos quais se fez um estudo molecular aprofundado. As principais características dos CNV escolhidos encontram-se representadas na tabela seguinte (Tabela 15).

Tabela 15. Informações acerca dos CNV escolhidos.

ID	Herança	CNV	Tamanho (pb)	Banda	Genes relevantes
Individuo 1	Paterna	duplicação	1,090,007	3p22.1 3p22.2	<i>ACVR2B</i> , <i>AXUD1</i> , <i>CCR8</i> , <i>CX3CR1</i> , <i>EXOG</i> , <i>GORASP1</i> , <i>MOBP</i> , <i>RPSA</i> , <i>SLC25A38</i> , <i>SCN5A</i> , <i>SCN10A</i> , <i>SCN11A</i> , <i>SNORA6</i> , <i>SNORA62</i> , <i>TTC21A</i> , <i>XIRP1</i> , <i>WDR48</i>
Individuo 2	Materna	duplicação	7,448	9q21.13	<i>ANXA1</i>
Individuo 3	<i>De novo</i>	deleção	3,683,498	9q31.1	<i>ABCA1</i> , <i>CYLC2</i> , <i>GRIN3A</i> , <i>LOC286367</i> , <i>NIPSNAP3A</i> , <i>NIPSNAP3B</i> , <i>OR13C2</i> , <i>OR13C3</i> , <i>OR13C4</i> , <i>OR13C5</i> , <i>OR13C8</i> , <i>OR13C9</i> , <i>OR13D1</i> , <i>OR13F1</i> , <i>SLC44A1</i> , <i>SMC2</i>
Individuo 4	Materna	deleção	156,493	11q14.3	<i>GRM5</i>
Individuo 5	<i>De novo</i>	deleção	155,735	11q14.3	<i>GRM5</i>
Individuo 6	<i>De novo</i>	deleção	1,536,281	16p13.11	<i>ABCC1</i> , <i>ABCC6</i> , <i>ABCC6P2</i> , <i>C16orf45</i> , <i>C16orf63</i> , <i>KIAA</i> , <i>MPV17L</i> , <i>MYH11</i> , <i>NDE1</i> , <i>NOMO1</i> , <i>NOMO3</i> , <i>NPIP</i> , <i>NTAN1</i> , <i>PDXDC1</i> , <i>RRN3</i>
Individuo 7	Materna	deleção	1,583,026	16p13.11 16p13.12	<i>ABCC1</i> , <i>ABCC6</i> , <i>ABCC6P2</i> , <i>C16orf45</i> , <i>C16orf63</i> , <i>KIAA</i> , <i>MIR484</i> , <i>MIR1972</i> , <i>MIR3179</i> , <i>MIR3180</i> , <i>MPV17L</i> , <i>MYH11</i> , <i>NDE1</i> , <i>NOMO1</i> , <i>NOMO3</i> , <i>NPIP</i> , <i>NTAN1</i> , <i>PDXDC1</i> , <i>PLA2G10</i> , <i>RRN3</i>
Individuo 8	Materna	duplicação	739,612	20p13	<i>PDYN</i> , <i>SIRPA</i> , <i>SNORD119</i> , <i>SNRPB</i> , <i>STK35</i> , <i>TGM3</i> , <i>TGM6</i> , <i>TMC2</i> , <i>ZNF343</i>

Numa análise inicial dos CNV, constata-se que a maioria pertencem a indivíduos do sexo masculino, como seria de esperar, visto que o autismo é muito mais frequente em rapazes. Além disso, apresentam um tamanho superior a 1 Mb e são herdados de um dos progenitores. Todos contêm genes, três deles correspondem a duplicações, presentes nas bandas 3p22.1-22.2, 9q21.13 e 20p13 e cinco a deleções, uma na banda 9q31.1, duas na 11q14.3 e duas na 16p13.11-13.12.

2. Controlo de qualidade das amostras de DNA

Antes de se iniciar o estudo dos CNV a nível genético, efetuou-se um controlo de qualidade das amostras que iriam ser usadas. Neste âmbito, foi feita a quantificação das soluções *stock* das amostras e verificou-se se havia algum tipo de contaminação das mesmas através da análise da razão 260/280 (Tabela Suplementar 5) e da observação das amostras em gel de agarose (Figura Suplementar 2).

Em todas as amostras esta razão encontra-se próxima dos valores normais, entre 1,7 e 2, o que significa que nenhuma delas está contaminada. Verificou-se este resultado com a análise do gel de agarose, que também não revelou qualquer tipo de contaminação das amostras, visto não se observar nenhum tipo de arrastamento de DNA.

Depois desta primeira fase, iniciou-se o estudo genético dos CNV, tendo sido feita primeiro a sua validação, seguida da sequenciação dos pontos de quebra, apenas nos indivíduos em que o CNV foi validado. Os pontos de quebra consistem nas barreiras físicas das deleções ou duplicações e o seu estudo é importante, visto que as suas sequências são cruciais para associar o genótipo dos pacientes ao fenótipo de autismo (Korbel *et al.*, 2007).

3. Duplicação na banda 3p22.1/22.2

3.1 Validação do CNV

No que diz respeito à duplicação presente no cromossoma 3, para a sua validação recorreu-se, mais uma vez, ao qPCR como método de validação. Foram desenhados dois ensaios nos genes *SCN5A* e *XIRP*, no interior da duplicação e no caso do ensaio desenhado no gene *SCN5A*, é amplificado um produto de *PCR* com um tamanho de 60 pb e para o *XIRP1* o tamanho do produto de *PCR* corresponde a 65 pb. Os ensaios controlo estão nos genes *NRXN1*, *PARK2* e *SLC24A3* (Figura 17).

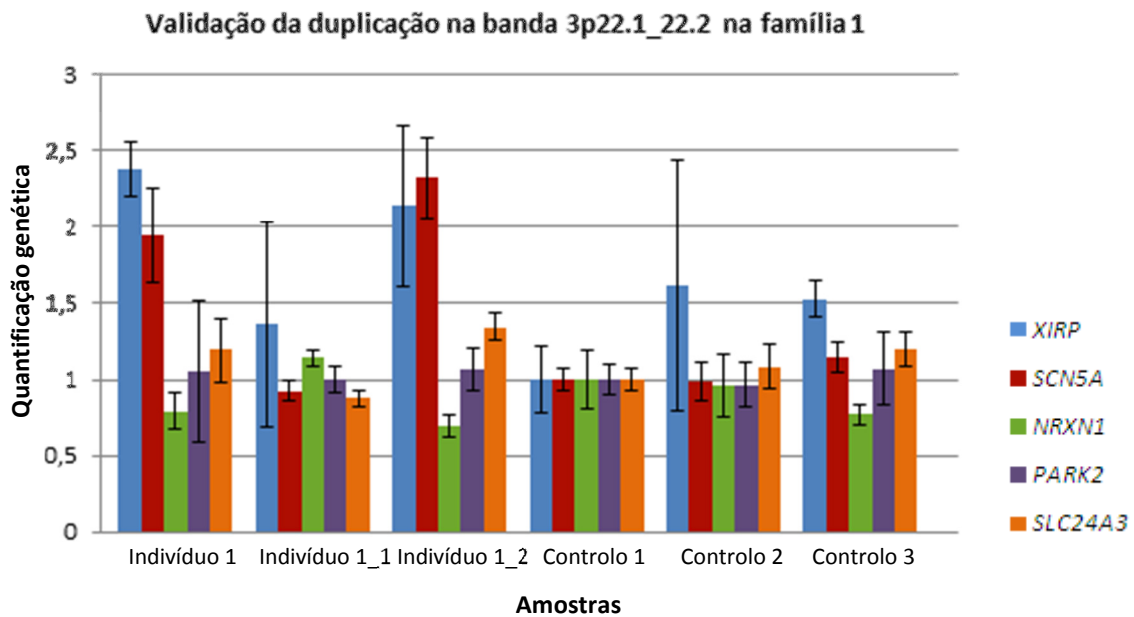


Figura 17. Método de validação da duplicação na banda 3p22.1_22.2 na família 1 (Indivíduo 1 – criança; Indivíduo 1_1 – mãe; Indivíduo 1_2 – pai).

Em ambos os ensaios de validação, obtiveram-se quantificações de valor duplicado para o indivíduo 1 e para o seu pai (indivíduo 1_2), confirmando-se a heritabilidade desta duplicação. Apesar disso, o controlo *NRXN1* apresenta um valor de quantificação mais reduzido que o normal, em ambos os indivíduos nos quais a duplicação está presente, mas isso não parece interferir no resto do ensaio. No que diz respeito à mãe da criança (indivíduo 1_1), os ensaios testados e os ensaios controlo apresentam todos valores próximos da unidade, exceto o ensaio desenhado no gene *XIRP*, cujo valor de quantificação parece estar um pouco aumentado. Os ensaios controlo apresentam valores próximos da unidade para todos os genes estudados, exceto o gene *XIRP1*, que está um pouco aumentado em dois dos controlos (controlos 2 e 3).

3.2 Mapeamento dos pontos de quebra

Nesta fase do trabalho, o objetivo foi obter a sequência exata dos pontos de quebra do CNV e para isso foram desenhados vários *primers forward* ao longo do ponto de quebra distal e vários *primers reverse*, ao longo do ponto de quebra proximal, para que fosse obtida a sequência exata do ponto de quebra do CNV.

Mas, neste caso, não foi possível fazer o mapeamento dos pontos de quebra, devido a não se conseguir otimizar alguns PCR. Na figura seguinte está representado o CNV, sendo indicado o esquema de desendo dos pontos de quebra, com os locais onde foram desenhados os *primers forward* e *reverse* e a possível localização dos pontos de quebra (Figura 18).

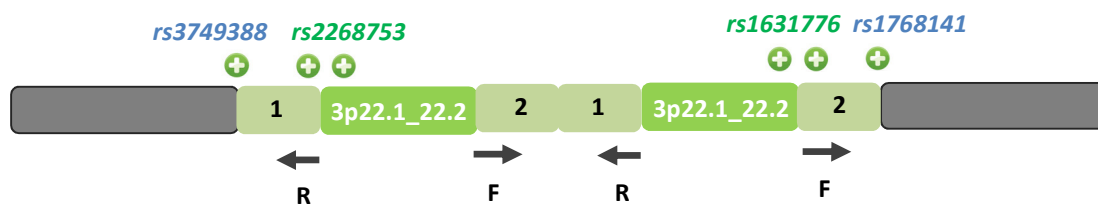


Figura 18. Estratégia de mapeamento dos pontos de quebra nos indivíduos com deleções no cromossoma 3, Indivíduo 1 (1. Possível localização do ponto de quebra proximal: *chr3*:38,471,305-38,475,193; 2. Possível localização do ponto de quebra distal: *chr3*: 39,565,199-39,565,295); (+ - SNP com sinal normal; + + - SNP duplicado).

Foi ainda efectuada uma pesquisa de LCR no possível local de ambos os pontos de quebra, para verificar se seria por esta razão que não era possível fazer a optimização dos PCR. Apesar disso, não foram encontrados LCR em nenhuma das zonas, sendo possível que haja outro tipo de variação genómica nesta zona cromossómica que está a influenciar os resultados.

3.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família

O indivíduo com a duplicação no cromossoma 3 é do sexo masculino, tem 20 anos e é caucasiano. Foi-lhe feito um diagnóstico de autismo aos 11 anos, com a obtenção de resultados positivos nos testes ADIR e ADOS e este é de origem idiopática. Apresenta uma deficiência mental ligeira a moderada, com um QI de 66 e revela atrasos a nível da linguagem, visto que só desenvolveu a capacidade de formar frases aos 72 meses. Além disso, apresenta atrasos a nível do desenvolvimento psicomotor e alterações num exame neurológico, que revela uma atrofia cerebral, do lado direito do hipocampo. Foi-lhe receitada risperidona e não tem problemas visuais ou auditivos. Não existem resultados dos testes PSP-Q e SRS para esta família, não se podendo verificar se os pais apresentavam algum tipo de incapacidade a nível social. Em relação à história familiar, o pai tem esquizofrenia a qual parece ser transmitida para a geração seguinte, pois um dos irmãos do probando também possui esta patologia. Apenas a mãe tem um fenótipo normal, visto que também o outro irmão do probando revela o fenótipo de autismo (Tabela 16).

Tabela 16. Informação clínica do indivíduo 1.

Dados clínicos	Indivíduo 1
Diagnóstico	Autismo
Idade de diagnóstico	11 anos
ADIR	Positivo
ADOS	Autismo
QI	Deficiência mental ligeira a moderada (66) (Griffiths)
Etiologia	Idiopático
Atraso de linguagem	Apresenta atrasos na linguagem
Atraso no desenvolvimento psicomotor	Revela alguns atrasos a nível do desenvolvimento psicomotor
Alterações neurológicas	Atrofia cerebral, a nível do lado direito do hipocampo
Problemas visuais ou auditivos	Não
Outros problemas	Não
Medicação	Risperidona
PSP-Q	-
SRS	-
História familiar	O pai tem esquizofrenia e historial de agressão para a mãe, que apresenta um fenótipo normal e tem dois irmãos do sexo masculino, um com esquizofrenia e outro com autismo

Neste caso, a duplicação presente nesta zona do cromossoma 3 parece contribuir para o desenvolvimento de autismo na criança e talvez também contribua para o fenótipo de esquizofrenia, visto que ocorre uma transmissão do CNV. Além disso, a criança revela ainda deficiência mental e atrasos na linguagem e desenvolvimento psicomotor, o que pode também ser influenciado pela disrupção de vários genes, entre os quais o *SCN11A*, provocada por este CNV. Foi desenhado o *pedigree* desta família, pois o CNV foi validado na criança e no pai, sendo necessário fazer uma análise da transmissão do fenótipo na família, presente na figura seguinte (Figura 19).

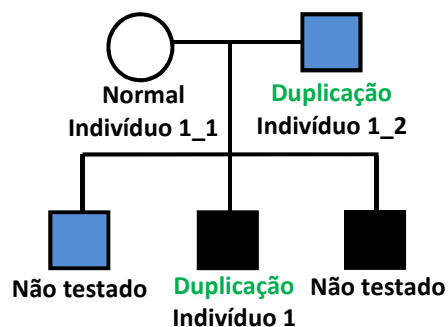


Figura 19. Análise da transmissão do fenótipo na família 1 (cor preta: indivíduo com PEA; cor azul: indivíduo com esquizofrenia; os restantes indivíduos apresentam um fenótipo normal).

Como se pode observar no pedigree, o indivíduo 1 tem dois irmãos, um com esquizofrenia e o outro com autismo, o que torna importante que, em estudos futuros, se faça a análise deste CNV em ambos, para verificar se este está ou não presente e envolvido no fenótipo das crianças.

4. Duplicação na banda 9q21.13

Em relação aos indivíduos que têm a região 9q21.13 duplicada, foi feita uma abordagem um pouco diferente dos restantes CNV que foram estudados. Este CNV já tinha sido estudado anteriormente, tendo sido feita a sua validação e sequenciados os seus pontos de quebra em vários indivíduos autistas, provenientes da população portuguesa e de outras populações. Devido à sua elevada prevalência, foi considerado importante fazer o rastreio deste CNV em alguns indivíduos da população portuguesa de casos de autismo, correspondentes às amostras que não foram genotipadas e numa população de controlos, para verificar se a duplicação estava ou não presente.

4.1 Rastreio populacional em casos e controlos

Nesta parte do estudo, usou-se uma subamostra da população portuguesa de casos de autismo do AGP, composta por 104 indivíduos e uma amostra de controlos de várias zonas do país, composta por 265 indivíduos. No decorrer deste rastreio, foram usados os *primers ANXA1_1 (Forward)* e *ANXA1_4 (Reverse)* e nos casos de autismo (Figura Suplementar 3), obteve-se um resultado positivo apenas para o indivíduo 2, fazendo-se, de seguida, a confirmação deste resultado com a elaboração de um novo PCR nas mesmas condições, em todos os indivíduos da família. Analisando os resultados, conclui-se que a duplicação estava realmente presente no indivíduo 2 e era herdada da mãe (indivíduo 2_1), como se pode observar na figura seguinte. No que diz respeito ao rastreio na população de controlos (Figura Suplementar 4), foi também encontrada uma amostra com a duplicação, sendo a sua frequência na população de controlos usada, 3,8%, a qual é muito inferior à observada na população de casos de autismo (Figura 20).

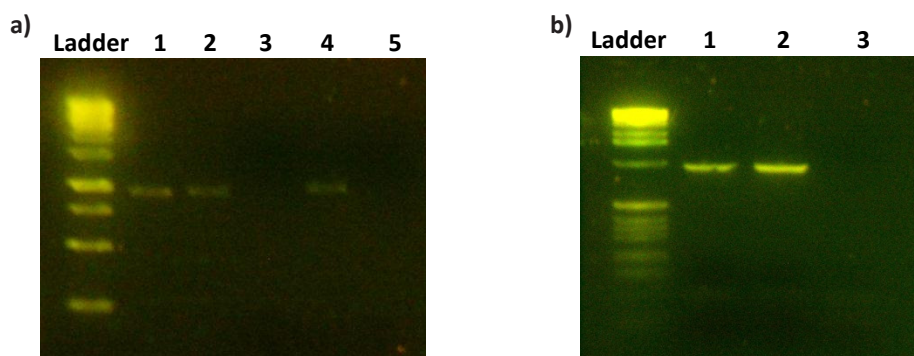


Figura 20. Gel de agarose com o caso e controlo que têm a duplicação na banda 9q21.13 **a)** Gel de agarose com a combinação de *primers ANXA1_1* e *ANXA1_4* que revela a presença da duplicação no probando (Indivíduo 2) (1) e na mãe (Indivíduo 2_1) (2), não se verificando a presença da mesma no pai (indivíduo 2_2) (3) e controlos positivo (4) e negativo (5); **b)** Gel de agarose com a combinação de *primers ANXA1_1* e *ANXA1_4* que revela a presença da duplicação no controlo (1). São também apresentados os controlos positivo (2) e negativo (3).

4.2 Mapeamento dos pontos de quebra

Nas três amostras em que se obtiveram resultados positivos para a presença da duplicação na banda 9q21.13 (Indivíduo 2, indivíduo 2_1 e controle), foi feita a sequenciação dos pontos de quebra, na qual foram usados os mesmos *primers forward* e *reverse* que foram usados para o rastreamento desta duplicação em casos e controles.

Concluiu-se que a duplicação presente nos indivíduos 2, 2_1 correspondia à que já tinha sido estudada previamente, visto que os pontos de quebra obtidos eram os mesmos que já tinham sido observados anteriormente (Tabelas Suplementares 10, 11 e 12). Os resultados da sequenciação dos pontos de quebra da duplicação do 9q21.13 foram os mesmo nos três indivíduos supracitados e podem ser observados na figura seguinte (Figura 21).

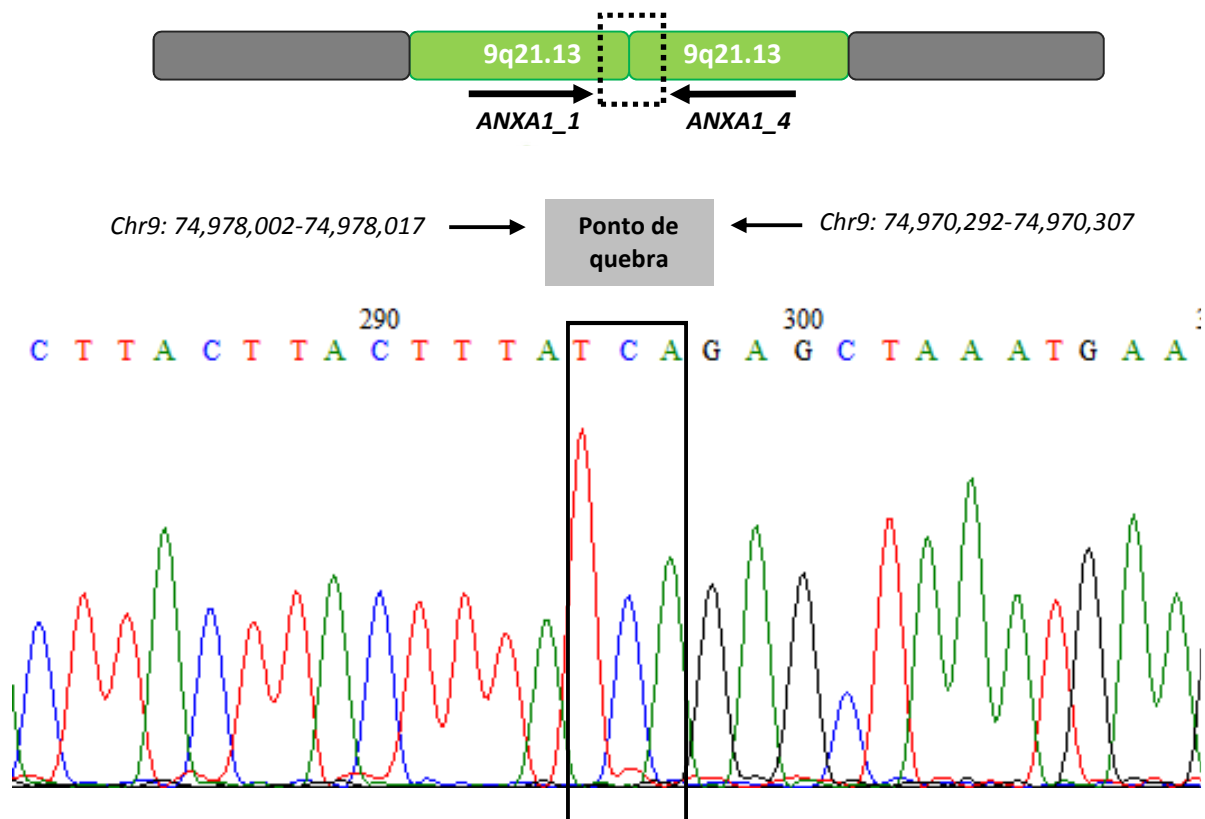


Figura 21. Resultados da sequenciação da banda resultante PCR da combinação de *primers* ANXA1_1 e ANXA1_4.

Concluiu-se, com recurso ao *software Bioedit*, que o ponto de quebra se localiza nas bases TCA, visto que as três pertencem às sequências localizadas antes e depois do CNV (Tabelas Suplementares 5, 6 e 7). Sendo assim, o ponto de quebra proximal localiza-se na posição *chr9*: 74,970,292 e o ponto de quebra distal na posição *chr9*: 74,978,018, nos três indivíduos estudados.

4.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família

O indivíduo com a duplicação presente na zona 9q21.13 é caucasiano, tendo-lhe sido realizado um diagnóstico de autismo de natureza idiopática. Os testes ADIR e ADOS deram ambos um resultado positivo e o indivíduo apresenta um QI normal. Tem atrasos no desenvolvimento psicomotor e da linguagem, visto que só começou a dizer as primeiras frases aos 36 meses de idade. Apesar disso, não apresenta alterações neurológicas nem problemas visuais ou auditivos e não lhe foi receitado qualquer tipo de medicação. Além disso, revela alguma agressividade e problemas de sono. Os seus pais e as suas duas irmãs apresentam um fenótipo normal e não foram realizados os testes PSP-Q e SRS, não se podendo concluir se os pais têm défices a nível da interação social (Tabela 17).

Tabela 17. Informação clínica do indivíduo 2.

Dados clínicos	Indivíduo 2
Diagnóstico	Autismo
Idade de diagnóstico	
ADIR	Positivo
ADOS	Autismo
QI	Normal
Etiologia	Idiopático
Atraso de linguagem	Sim
Atraso no desenvolvimento psicomotor	Sim
Alterações neurológicas	Não
Problemas visuais ou auditivos	Não
Medicação	Não
PSP-Q	-
SRS	-
História familiar	Tem duas irmãs com um fenótipo normal

A duplicação do gene *ANXA1* pode neste caso contribuir para os atrasos observados a nível da linguagem e do desenvolvimento psicomotor, além do fenótipo de autismo. Apesar de a duplicação ser herdada da mãe e esta ter um fenótipo normal, foi considerado ainda importante o desenho do *pedigree*, com uma análise da transmissão do fenótipo na família (Figura 22).

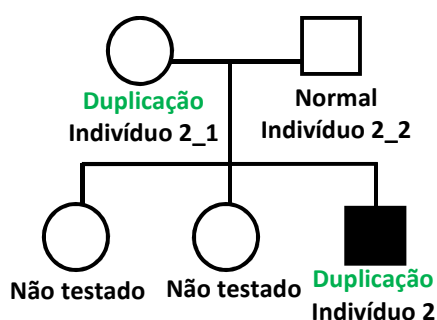


Figura 22. Análise da transmissão do fenótipo na família 2 (cor preta: indivíduo com PEA; os restantes indivíduos apresentam um fenótipo normal).

5. Deleção na banda 9q31.1

5.1 Validação do CNV

A validação deste CNV fez-se com recurso ao método de qPCR, tendo sido desenhados dois ensaios, um no gene *CYLC2* e outro no gene *GRINA*, ambos no interior do CNV e a cerca de 1 Mb de distância um do outro, sendo amplificados produtos de PCR com um tamanho de 74 pb em ambos os casos. Além disso, usaram-se três ensaios controlo desenhados nos genes *NRXN1*, *PARK2* e *SLC24A3*, cujos valores de quantificação genética se encontram próximos da unidade e que, por isso, permitem que seja feita uma comparação com os resultados obtidos (Figura 23).

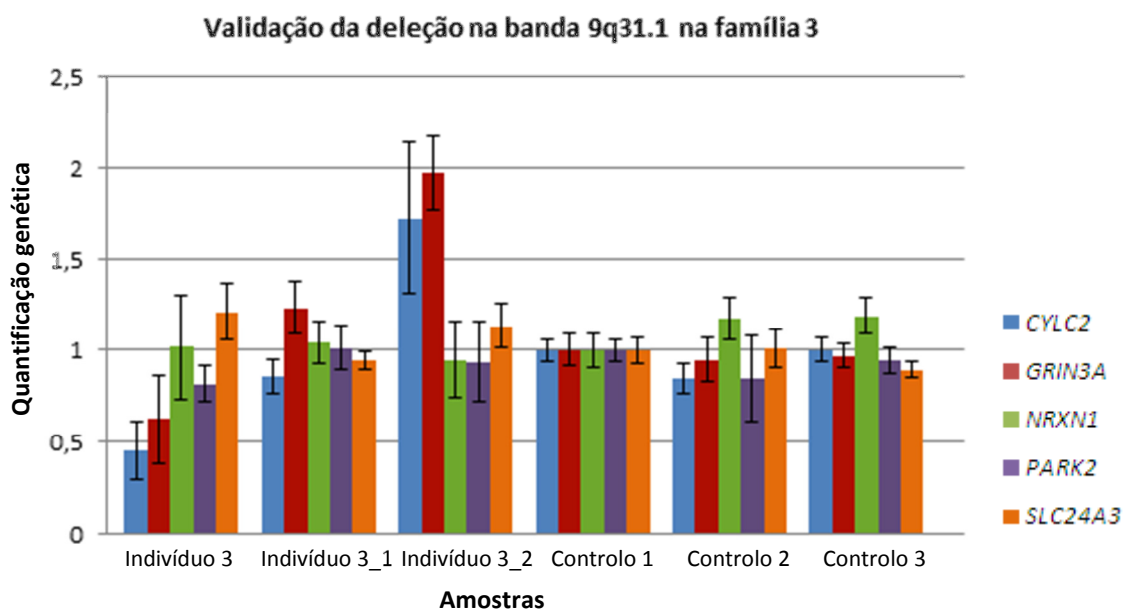


Figura 23. Método de validação da deleção *9q31.1* na família 3 (Indivíduo 3 – criança; Indivíduo 3_1 – mãe; Indivíduo 3_2 – pai).

Com a análise dos resultados obtidos, conclui-se que a deleção aparece *de novo*, estando presente apenas na criança (indivíduo 3). Como se pode observar, a criança apresenta valores de quantificação próximos da unidade para os genes controlo (*NRXN1*, *PARK2* e *SLC24A3*), enquanto são visíveis valores de quantificação reduzidos a metade, no caso dos genes *CYLC2* e *GRIN3A*, o que implica a presença da deleção. No que diz respeito aos pais, observa-se que nenhum deles tem a deleção visto não terem uma quantificação reduzida a metade de nenhum dos genes em estudo. No caso da mãe (Indivíduo 3_1), pode-se concluir que esta não possui nenhum CNV nesta zona, uma vez que os valores de quantificação de todos os genes em estudo se encontram próximos da unidade. O pai (Indivíduo 3_2) parece ter os genes *CYLC2* e *GRIN3A* duplicados, pois foram obtidos valores de quantificação próximos de dois para ambos.

5.2 Mapeamento dos pontos de quebra

Nesta fase do trabalho, desenharam-se vários *primers forward* e *reverse*, para que, pelo mecanismo de *primer walking* fosse localizado o ponto de quebra (Tabela Suplementar 8). Depois de realizada a otimização dos PCR e de sequenciados os produtos de PCR originados, houve alguma dificuldade na leitura das seqüências, por isso recorreu-se ao método de *Nested PCR*, para aumentar a especificidade. No desenvolvimento deste método, o produto de PCR amplificado pelos primers *CHR9_F2* e *CHR9_R2* foi usado como substrato para um novo PCR, no qual se utilizaram outras combinações de *primers* localizados mais internamente, entre os quais *CHR9_F3*, *CHR9_F4*, *CHR9_F5*, *CHR9_R3*, *CHR9_R4* e *CHR9_R5* (Tabela Suplementar 8). Os resultados foram visualizados em gel de agarose, que está representado na figura seguinte (Figura 24).

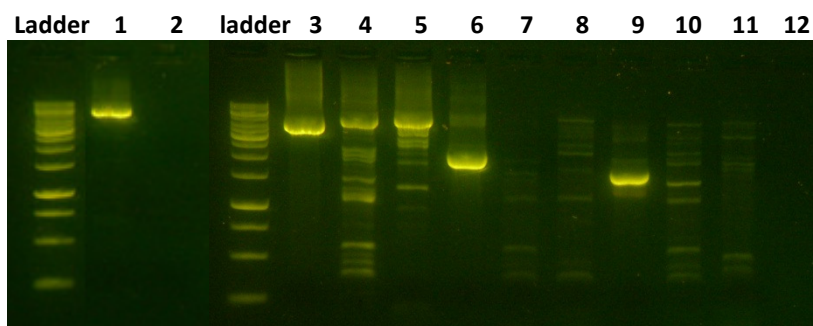


Figura 24. Gel de agarose com amostras do indivíduo 3, cujas bandas resultam de várias combinações de primers: PCR normal com a combinação de *primers CHR9_F2/CHR9_R2* (1) e controle negativo (2); *Nested PCR* com as combinações de primers *CHR9_F3/CHR9_R3* (3), *CHR9_F3/CHR9_R4* (4), *CHR9_F3/CHR9_R5* (5), *CHR9_F4/CHR9_R3* (6), *CHR9_F4/CHR9_R4* (7), *CHR9_F4/CHR9_R5* (8), *CHR9_F5/CHR9_R3* (9), *CHR9_F5/CHR9_R4* (10), *CHR9_F5/CHR9_R5* (11) e controle negativo (12).

Depois de sequenciados os produtos de PCR cujas bandas estavam relativamente puras, observaram-se as seqüências originadas pelas bandas resultantes das combinações de *primers CHR9_F3/CHR9_R3*, *CHR9_F4/CHR9_R3* e *CHR9_F5/CHR9_R3*, com recurso ao *software BioEdit*. Concluiu-se que o ponto de quebra estava localizado no produto de PCR com 1,5 kb originado pelos *primers CHR9_F5* e *CHR9_R3* (Figura 25).

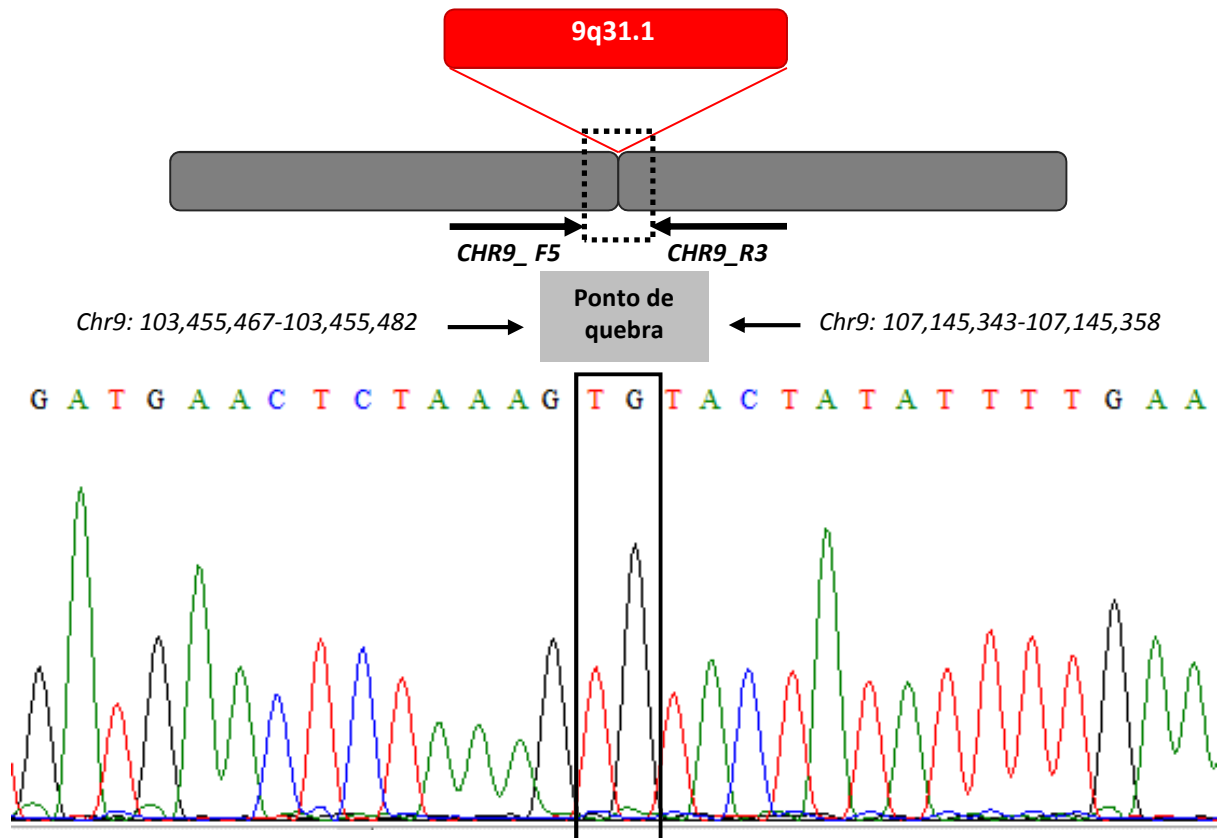


Figura 25. Resultados da sequenciação da banda originada pela combinação de *primers* CHR9_F5/CHR9_R3.

Com uma análise mais cuidada da sequência, pode-se concluir que o *ponto de quebra* se localiza nas bases *TG*, visto que ambas se localizam proximal e distalmente em relação ao CNV, estando o ponto de quebra proximal localizado na posição *chr9:103,455,482* e o distal na posição *chr9:107,145,343*. Além disso, existe ainda uma parte da sequência que está repetida antes e depois do ponto de quebra (microhomologia), sendo provavelmente esta que provocou a deleção, pois fez com que o processo de replicação se iniciasse num local diferente (Tabela Suplementar 9).

5.3 Caracterização clínica e relação com o fenótipo

Depois das análise dos dados clínicos do indivíduo com a deleção no cromossoma 9, concluiu-se que é do sexo masculino, tem 18 anos e é caucasiano. Aos 10 anos, foi-lhe diagnosticado síndrome de *Asperger* de origem idiopática. Nos testes ADIR e ADOS obtiveram-se resultados positivos e segundo o teste WISC III, concluiu-se que a criança não revela deficiência mental (QI de 93) nem atrasos a nível da linguagem e do desenvolvimento psicomotor. Não apresenta alterações neurológicas, nem qualquer tipo de problemas visuais ou auditivos. Não apresenta histórico familiar relacionado com qualquer tipo de perturbações neuropsiquiátricas (Tabela 18).

Tabela 18. Informação clínica do indivíduo 3.

Dados clínicos	Indivíduo 3
Diagnóstico	Síndrome de <i>Asperger</i>
Idade de diagnóstico	10 anos
ADIR	Positivo
ADOS	Autismo
QI	Normal
Etiologia	Idiopático
Atraso de linguagem	Não
Atraso no desenvolvimento psicomotor	Não
Alterações neurológicas	Não
Problemas visuais ou auditivos	Não
Medicação	Não
PSP-Q	-
SRS	-
História familiar	Pais e irmão saudáveis

Pode-se concluir que este indivíduo não apresenta nenhuma característica fenotípica adicional, o que sugere que a deleção da banda 9q31.1 esteja diretamente envolvida com o fenótipo de autismo, pois provoca a disrupção de genes importantes no SNC, como o *GRIN3A*.

6. Deleção na banda 11q14.3

6.1 Validação do CNV

A validação da deleção na banda 11q14.3 realizou-se nas famílias 4 e 5, pelo método de qPCR e foram usados os mesmos ensaios de validação em ambas as famílias, desenhados nos genes *GRM5* e numa região intergénica (*INTREG*), no interior da deleção e apresentam produtos de PCR com um tamanho de 60 pb para o gene *GRM5* e de 80 pb para o ensaio localizado em *INTREG*. Foram usados os ensaios controlo desenhados nos genes *NRXN1*, *PARK2* e *SLC24A3* (Figuras 26 e 27).

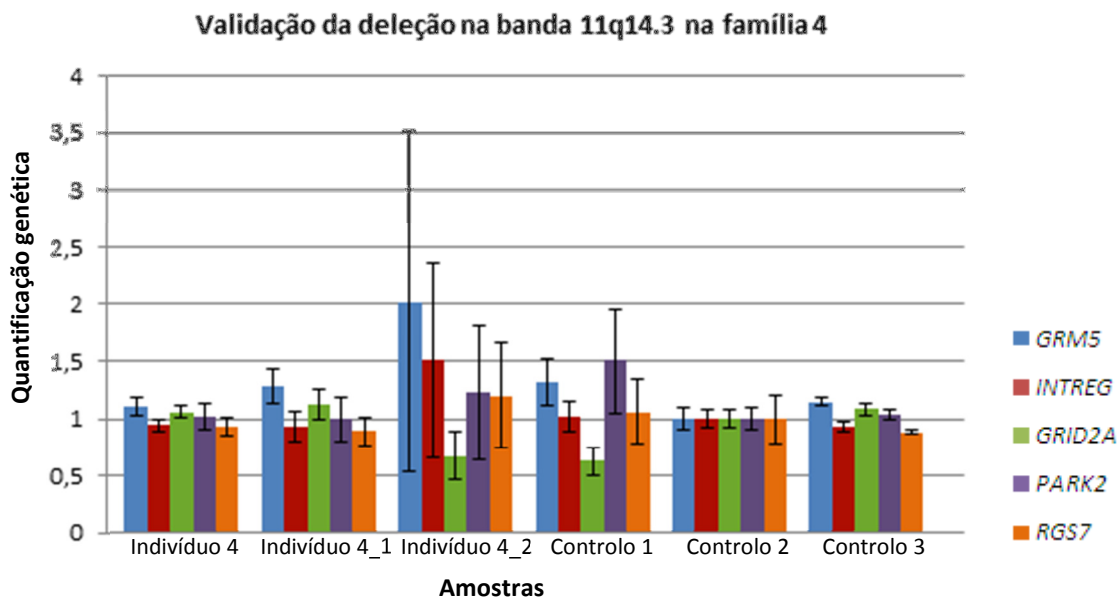


Figura 26. Validação da deleção na banda 11q14.3 na família 4 (Indivíduo 4 – criança; Indivíduo 4_1 – mãe; Indivíduo 4_2 – pai).

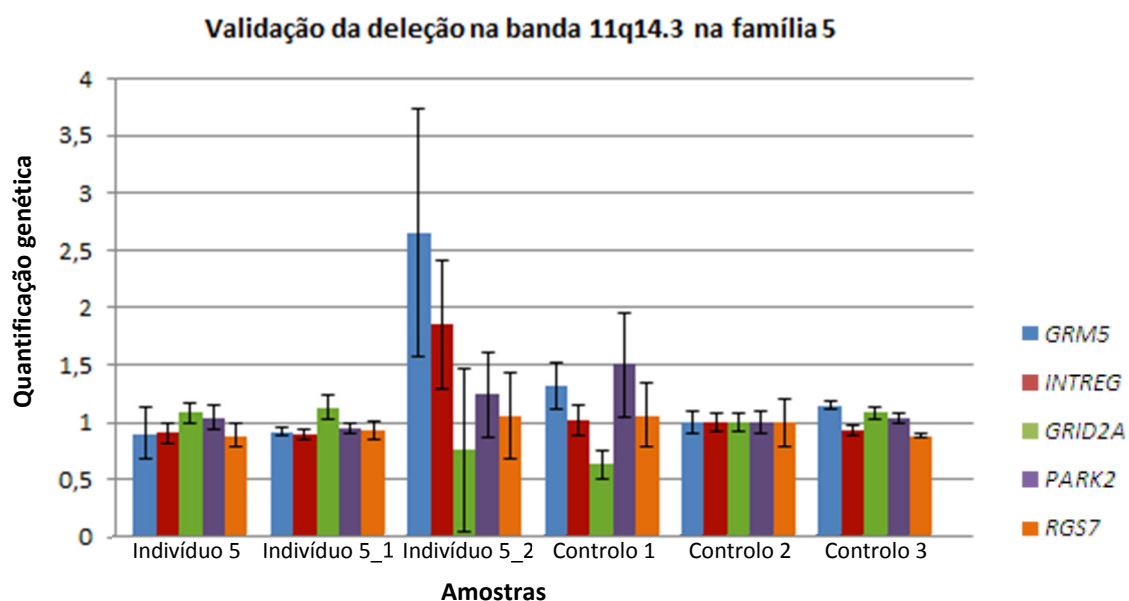


Figura 27. Validação da deleção na banda 11q14.3 na família 5 (Indivíduo 5 – criança; Indivíduo 5_1 – mãe; Indivíduo 5_2 – pai).

Depois de realizados os ensaios, conclui-se que o CNV não foi validado nos indivíduos 4 nem 4_1, como se pode observar no gráfico anterior, no qual ambos apresentam valores de quantificação genética próximos da unidade para todos os ensaios de validação e controlo. O pai parece ter uma duplicação na mesma zona onde se pretendia validar a deleção, pois a quantificação encontra-se próxima de 2 em ambos os ensaios. Além disso, um dos controlos usados (controlo 1) parece não ter

funcionado muito bem para nenhum dos ensaios, visto que são observados valores muito discrepantes.

Também no indivíduo 5, o CNV não foi validado, observando-se que este indivíduo e a mãe (indivíduo 5_1) têm valores próximos da unidade para todos os ensaios estudados, mas também neste caso, o pai parece ter uma duplicação na região deste CNV. Em relação aos controlos, mais uma vez o controlo 1 parece não ter funcionado tão bem, pois encontra-se um pouco díspar dos outros.

Tendo em conta, que a deleção na banda 11q14.3 não foi validada em nenhum dos casos estudados e apesar de estes ensaios de validação não serem os melhores, optou-se por não se continuar o estudo molecular deste CNV nem a caracterização clínica destes pacientes.

7. Deleção na banda 16p13.11-13.12

7.1 Validação dos CNV

No estudo dos CNV presentes no cromossoma 16, recorreu-se também ao método de qPCR, para os validar. Uma vez que os CNV dos indivíduos 6 e 7 não eram exatamente iguais, desenharam-se quatro ensaios diferentes, nos genes *ABCC1* e *NTNA1* para a família 6 e nos genes *KIAA* e *PDXDC1* no caso da família 7.

Em relação ao indivíduo 6, os ensaios foram desenhados no interior do CNV a cerca de 1,5 Mb de distância um do outro, sendo amplificados produtos de PCR com 66 pb no caso do *ABCC1* e de 80 pb no *NTNA1*. Os ensaios controlo usados foram desenhados nos genes *NRXN1*, *PARK2* e *SLC24A3* e a sua quantificação apresenta valores próximos da unidade.

Para a família 7 desenharam-se também dois ensaios, sendo obtidos produtos de PCR com um tamanho de 86 pb para o gene *KIAA* e de 60 pb para o *PDXDC1* e os ensaios controlo usados dizem respeito aos genes *RGS7* e *GRID2A*. Foi eliminado o ensaio controlo desenhado no gene *PARK2* por não ter funcionado bem (Figuras 28 e 29).

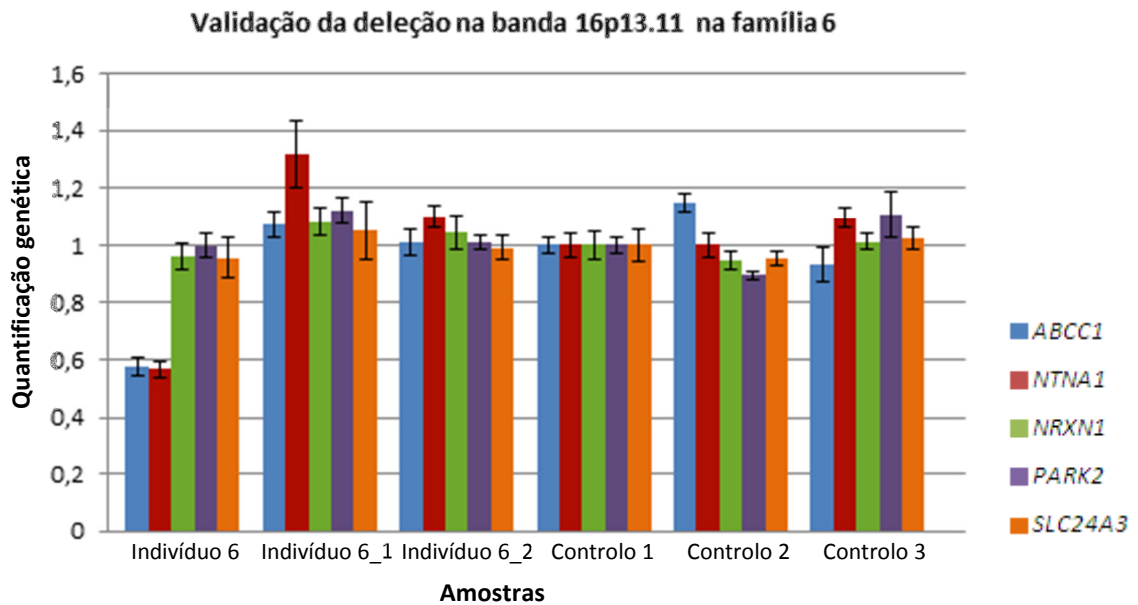


Figura 28. Validação da deleção na banda 16p13.11 na família 6 (Indivíduo 6 – criança; Indivíduo 6_1 – mãe; Indivíduo 6_2 – pai).

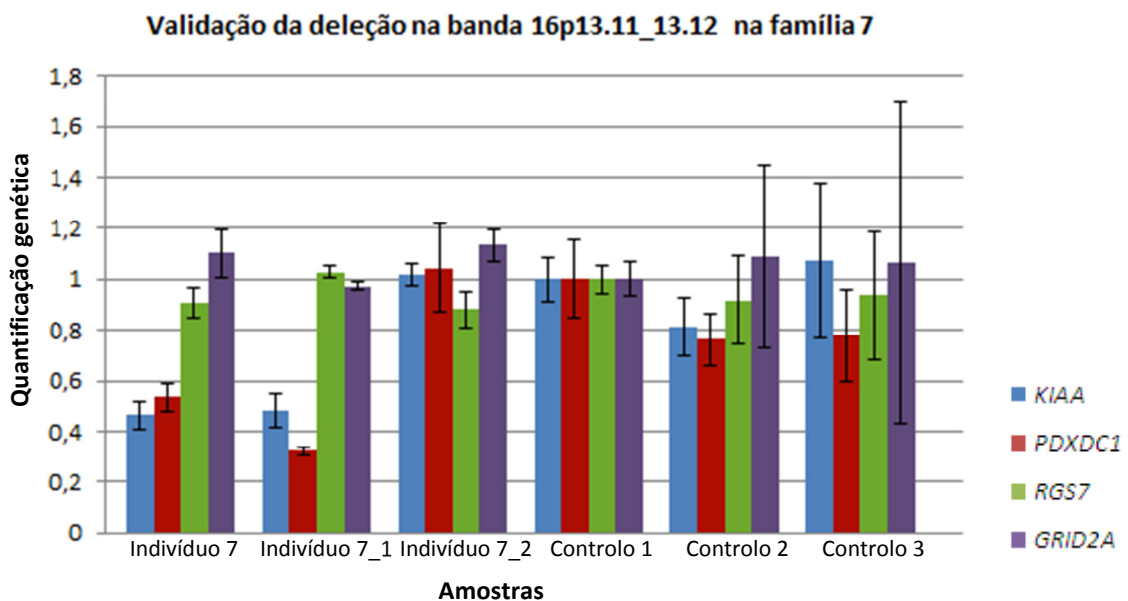


Figura 29. Validação da deleção na banda 16p13.11-13.12 na família 7 (Indivíduo 7 – criança; Indivíduo 7_1 – mãe; Indivíduo 7_2 – pai).

Como se pode observar, no caso da família 6, o CNV foi validado como sendo *de novo*, visto que ambos os ensaios de validação apresentam quantificações genéticas reduzidas a metade no probando (indivíduo 6), em relação aos ensaios controlo. O pai (indivíduo 6_2) e a mãe (Indivíduo 6_1) apresentam valores próximos da unidade para ambos os ensaios.

Em relação à família 7, concluiu-se que a deleção está presente e é herdada da mãe, pois foram obtidos valores de quantificação genética reduzidos a metade, tanto na criança (indivíduo 7),

como na mãe (indivíduo 7_1), para ambos os ensaios de validação, nos genes *KIAA* e *PDXDC1*. O pai (indivíduo 7_2) apresenta valores de quantificação próximos da unidade para todos os ensaios. Nos ensaios controlo 2 e 3, os valores de quantificação de alguns genes encontram-se um pouco reduzidos.

7.2 Mapeamento dos pontos de quebra

Para realizar o mapeamento dos pontos de quebra de ambos os CNV, desenharam-se *primers* antes do primeiro SNP com sinal normal e depois do último SNP com sinal normal e depois efetuou-se a metodologia de *primer walking* ao longo dos pontos de quebra distal e proximal em ambos os CNV (Figura 30).

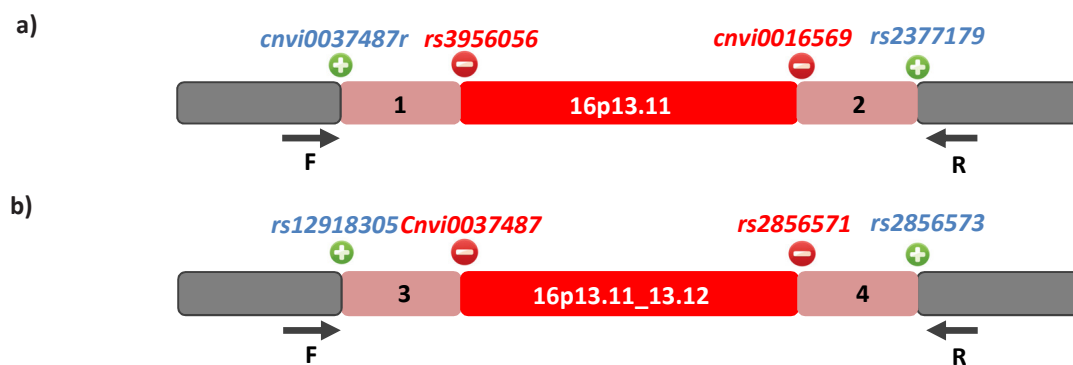


Figura 30. Estratégia de mapeamento dos pontos de quebra nos indivíduos com deleções no cromossoma 16; **a)** Indivíduo 6 (**1.** Possível localização do ponto de quebra proximal: *chr16:14,687,715-14,771,033*; **2.** Possível localização do ponto de quebra distal *chr16:16,307,313-16,312,044*); **b)** Indivíduo 7 (**3.** Possível localização do ponto de quebra proximal: *chr16:14,679,290-14,687,715*; **4.** Possível localização do ponto de quebra distal: *chr16:16,270,740-16,270,997*) (+ - SNP com sinal normal; - - SNP deletado).

No decorrer do processo de otimização, não se conseguiram eliminar algumas bandas inespecíficas e, depois de efetuada nova pesquisa bibliográfica, recorreu-se ao *browser* da USCS, concluindo-se que em ambos os CNV existem zonas com uma alta frequência de LCR nas regiões próximas dos pontos de quebra, o que faz com que os *primers* desenhados nesta zona hibridem noutros locais do genoma. Por esta razão, optou-se por se fazer uma análise bioinformática de ambos os CNV em relação à presença de LCR na possível localização dos pontos de quebra.

Os LCR correspondem a regiões com sequências repetitivas e altamente homólogas que aumentam a suscetibilidade para rearranjos a nível genómico, o que resulta nos CNV. O processo de recombinação pode ocorrer entre LCR diretos, o que origina as duplicações e deleções do material genético presente ou entre LCR invertidos, o que resulta na inversão da sequência genética.

As deleções identificadas neste trabalho, no cromossoma 16, nos indivíduos 6, 7 e 7_1, parecem ter sido causadas por estes LCR, visto que no caso do individuo 6, na possível localização do ponto de quebra, existe uma alta frequência de LCR, sendo que estes também podem ser observados junto ao ponto de quebra distal do CNV presente nos indivíduos 7 e 7_1 (Figuras 31 e 32).

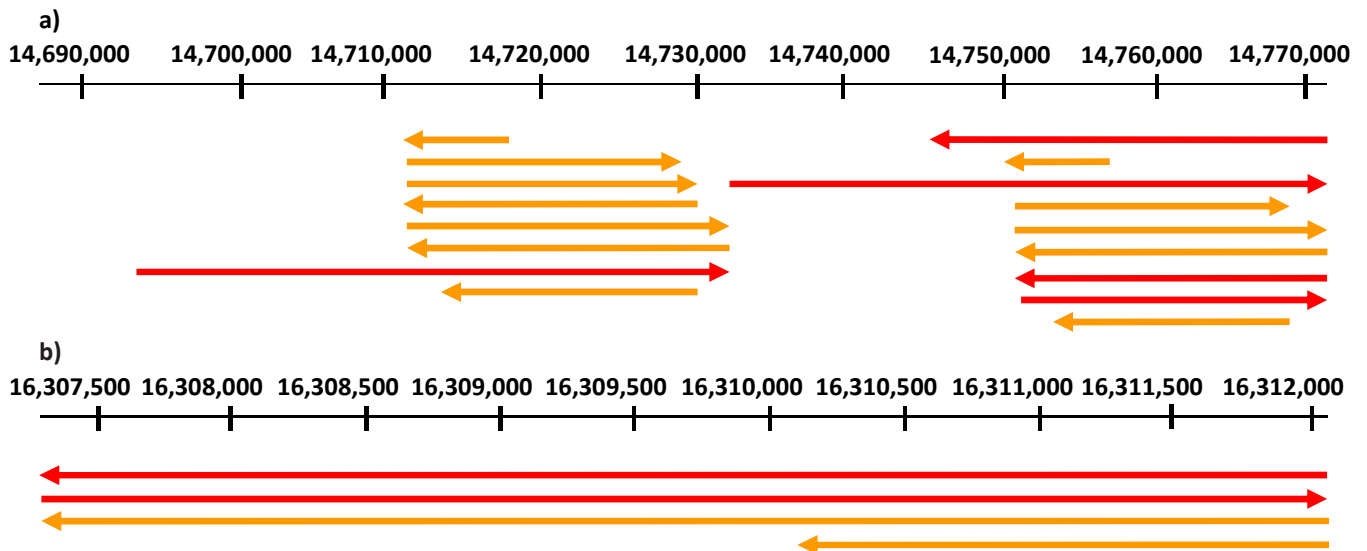


Figura 31. Análise da presença de LCR (>1kb) na possível localização de ambos os pontos de quebra do CNV 16p13.11 do indivíduo 6. **a)** Ponto de quebra proximal do CNV (*chr16:14,687,715-14,771,033*); **b)** Ponto de quebra distal do CNV (*chr16:16,307,313-16,312,044*) (laranja: sequências com 98% a 99% de similaridade; vermelho: sequências com mais de 99% de similaridade).

No caso do individuo 6, conclui-se que a deleção presente no cromossoma 16 é ladeada, distalmente e proximalmente por LCR, os quais se vão repetindo ao longo da sequência do ponto de quebra proximal e que também estão presentes no ponto de quebra distal do CNV. Sendo assim, concluiu-se apenas uma possível localização dos pontos de quebra, estando o proximal localizado na posição *chr16:14,687,715-14,771,033* e o distal na posição *chr16:16,307,313-16,312,044*.

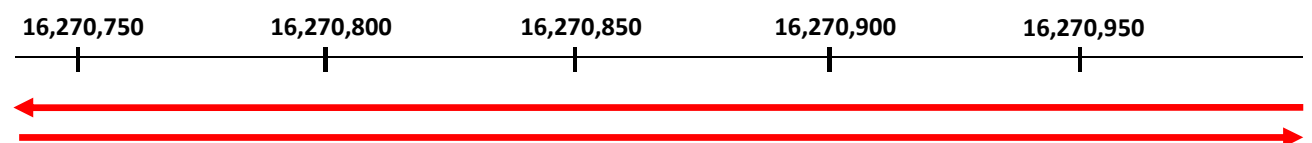


Figura 32. Análise da presença de LCR (>1kb) na possível localização do ponto de quebra distal do CNV 16p13.11-13.12 dos indivíduos 7 e 7_1 (*chr16:16,270,740-16,270,997*) (vermelho: sequências com mais de 99% de similaridade).

No que diz respeito aos indivíduos 7 e 7_1 apenas se observou a presença de LCR no ponto de quebra distal do CNV presente em ambos, mas, mesmo assim, não foi possível determinar a

posição exata dos pontos de quebra. Sendo assim, o ponto de quebra proximal está localizado na posição *chr16:14,679,290-14,687,715* e o distal na posição *chr16:16,270,740-16,270,997*.

7.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família

Analisando os dados clínicos de ambos os indivíduos com deleções no cromossoma 16, conclui-se que são ambos do sexo masculino e caucasianos, tendo o indivíduo 6, 17 anos e o indivíduo 7, 13 anos. Fez-se um diagnóstico de autismo atípico, ao indivíduo 6, aos 10 anos, com uma origem idiopática e os testes ADIR e ADOS deram resultados positivos. Este indivíduo apresenta uma deficiência mental ligeira (QI de 52) segundo o teste WISC III, mas não tem atrasos na linguagem nem no desenvolvimento psicomotor. Além disso, apresenta miopia e astigmatismo e foram-lhe receitados risperidona, norfluoxetina e catapresan, estando o primeiro indicado para o controlo dos sintomas associados ao autismo, como agitação e agressividade e os restantes para o tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo e da hipertensão arterial, respetivamente. O seu pai é saudável, mas a mãe tem esgotamentos, a irmã revela dificuldades de aprendizagem e tem um tio paterno com esquizofrenia. Ao indivíduo 7 foi-lhe diagnosticado síndrome de *Asperger* de origem idiopática aos 8 anos de idade e ambos os testes, ADIR e ADOS, deram resultados positivos. Este não apresenta deficiência mental, nem atrasos na linguagem ou ao nível do desenvolvimento psicomotor e não tem problemas visuais ou auditivos. Apesar de apresentar alterações neurológicas, não lhe foi receitada medicação para o autismo e não tem história familiar neuropsiquiátrica (Tabela 19).

Tabela 19. Informação clínica dos indivíduos 6 e 7.

Dados clínicos	Indivíduo 6	Indivíduo 7
Diagnóstico	Autismo atípico	Síndrome de <i>Asperger</i>
Idade de diagnóstico	10 anos	8 anos
ADIR	Positive	Positivo
ADOS	Autismo	Autismo
Deficiência mental	Ligeira	Normal
Etiologia	Idiopático	Idiopático
Atraso de linguagem	Não	Não
Atraso no desenvolvimento psicomotor	Não	Não
Alterações neurológicas	Não	Descoordenação motora
Problemas visuais ou auditivos	Miopia e astigmatismo	Não
Medicação	Risperidona, norfluoxetina e catapresan	Não
PSP-Q	-	Mãe - 2,2; Pai - 2,28
SRS	-	Mãe - 15; Pai - 43
História familiar	Mãe com esgotamentos, pai saudável, irmã com dificuldades de aprendizagem e tio paterno com esquizofrenia.	Mãe, pai e irmão saudáveis.

Visto que a deleção na banda 16p13.11_13.12 presente nos indivíduos 6 e 7 provocam a disrupção de genes candidatos para as PEA, entre os quais *NDE1* e *NTAN1*, este CNV parece estar

associado ao fenótipo de autismo atípico, apesar de não ser observado um padrão de transmissão do mesmo em nenhuma das famílias. Além disso, também a deficiência mental do indivíduo 6 parece estar associada a este CNV. No caso do indivíduo 7, que apresenta alterações a nível neurológico, o CNV está associado ao síndrome de *Asperger*, que apresenta um genótipo menos acentuado que o autismo, talvez porque a deleção é herdada da mãe e haja um mecanismo de regulação que evite a disrupção provocada por este CNV. De qualquer forma, fez-se uma análise mais detalhada da transmissão do fenótipo na família 7, pois a deleção é herdada, com a análise dos testes PSP-Q e SRS e concluiu-se que nenhum é significativo, nem para a mãe nem para o pai. Foi desenhado o pedigree da família 7, o qual está representado na figura seguinte (Figura 33).

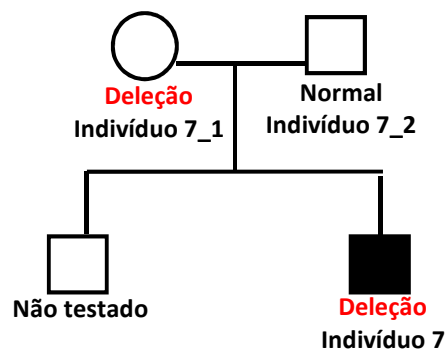


Figura 33. Análise da transmissão do fenótipo na família 7 (cor preta: indivíduos com PEA; os restantes indivíduos apresentam um fenótipo normal).

8. Duplicação na banda 20p13

8.1 Validação do CNV

Na validação da duplicação presente no cromossoma 20 por qPCR, desenharam-se ensaios nos genes *TGM3* e *ZNF343*. No caso do ensaio do gene *TGM3*, é amplificado um produto de PCR com 85 pb e para o *ZNF343*, um produto de PCR com 81 pb. Os ensaios controlo desenharam-se nos genes *RGS7* e *GRID2A*, e foi eliminado o do gene *PARK2*, que não funcionou bem (Figura 34).

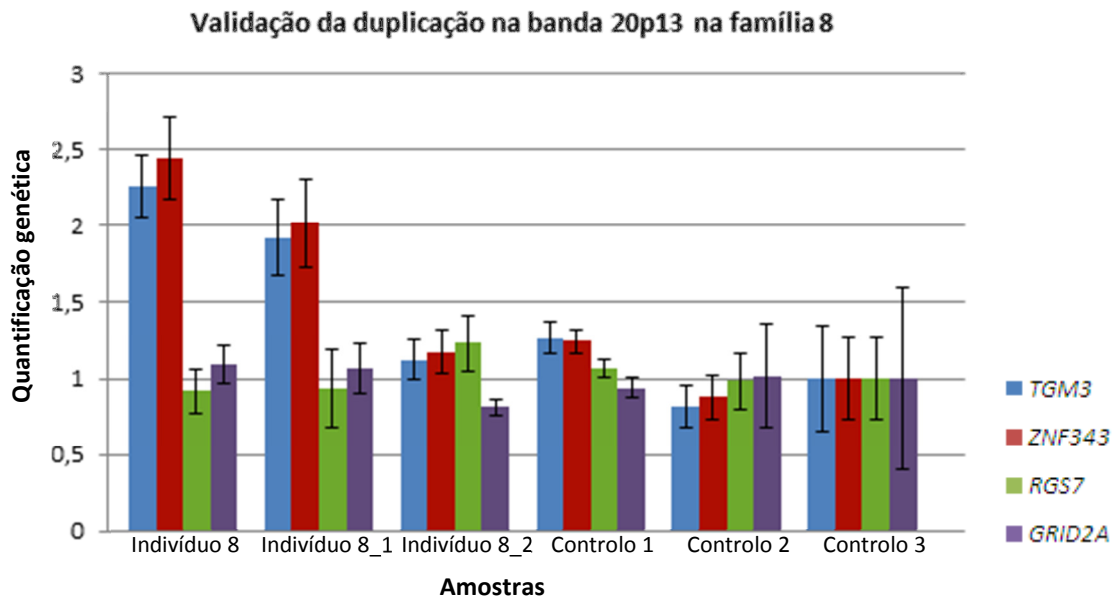


Figura 34. Validação da duplicação na banda 20p13 na família 8 (Indivíduo 8 – criança; Indivíduo 8_1 – mãe; Indivíduo 8_2 – pai).

A partir da análise do gráfico anterior conclui-se que ambos os ensaios de validação apresentam valores de quantificação duplicados para os ensaios testados (*TGM3* e *ZNF343*) no probando (indivíduo 8) e na mãe (indivíduo 8_1), o que revela a presença da duplicação nestes indivíduos e confirma a heritabilidade da mesma, tendo os ensaios controlo, relativos ao *RGS7* e *GRID2A*, valores próximos da unidade. No que diz respeito ao pai da criança (indivíduo 8_2), todos os ensaios apresentam valores próximos da unidade, apesar do ensaio controlo desenhado no gene *GRID2A* estar um pouco reduzido. Em relação aos controlos, este apresentam valores relativamente próximos da unidade para os ensaios controlo, apesar da variação dos valores de quantificação ser um pouco mais elevada, para os ensaios do *TGM3* e *ZNF343*.

8.2 Mapeamento dos pontos de quebra

Para obter a sequência exata dos pontos de quebra deste CNV, desenharam-se vários *primers forward* e *reverse*, para que, pelo mecanismo de *primer walking* fossem localizados os pontos de quebra. Neste caso, optou-se por se fazer a amplificação de uma banda com um maior tamanho (10 kb), tendo-se depois feito a sequenciação dos produtos de PCR, com recurso a outros *primers*, com uma localização relativamente próxima dos pontos de quebra. Sendo assim, foi amplificado o mesmo produto de PCR na mãe (Indivíduo 8_1) e na criança (Indivíduo 8), com recurso aos *primers CHR20_F1* e *CHR20_R1* e os resultados foram visualizados no gel de agarose, representado na figura seguinte. Depois, sequenciou-se este produto de PCR com recurso a vários

primers, sendo que aquele que tornou possível a descoberta do ponto de quebra foi o *primer CHR20_F7*. Os resultados estão apresentados nas figuras seguintes (Figuras 35 e 36).

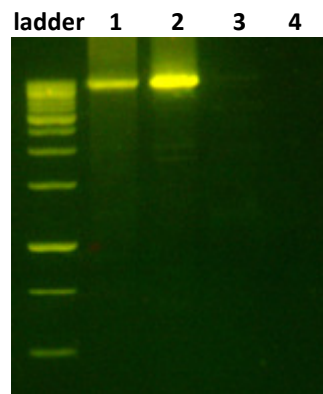


Figura 35. Gel de agarose com várias amostras da família 8, cujas bandas resultam da combinações de *primers* CHR20_F1/CHR20_R1: Indivíduo 1 (1); Indivíduo 1_1 (2); Indivíduo 1_2 (3) e controle negativo (4).

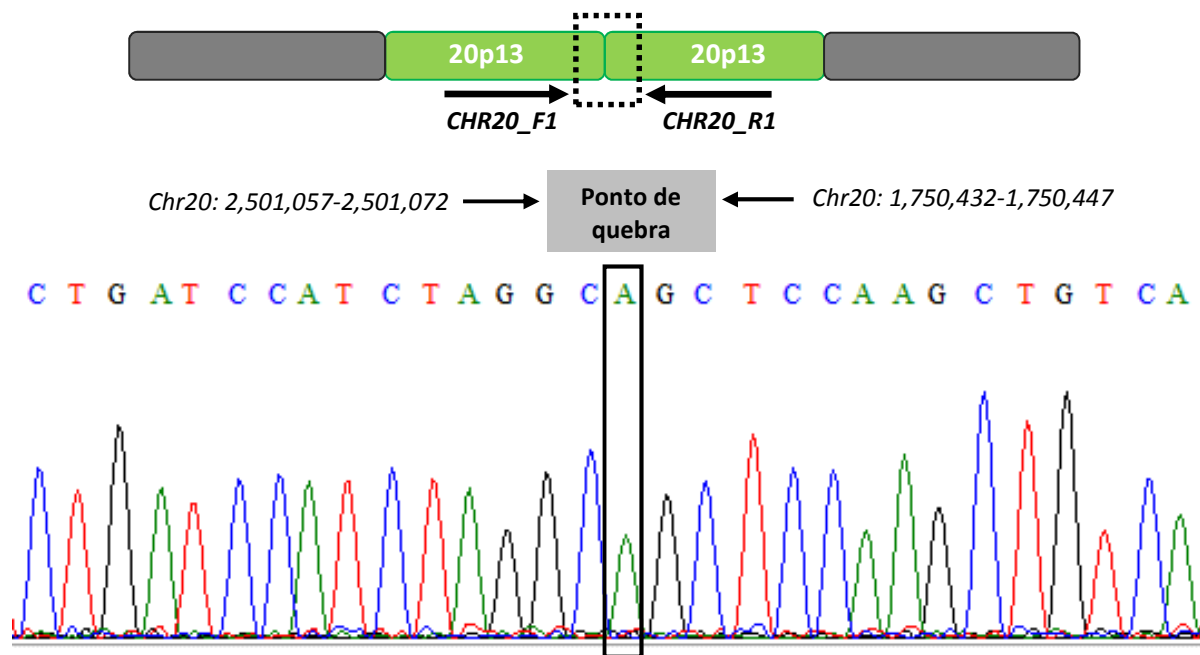


Figura 36. Resultados da sequenciação da banda originada pelo *primer* CHR20_F7.

Com a análise da sequência no *software* Bioedit, pode-se concluir que o ponto de quebra se localiza na base A, visto que ambas se localizam proximal e distalmente em relação ao CNV, estando o ponto de quebra proximal localizado na posição *chr20:2,501,072* e o distal na posição *chr20:1,750,432*. Também neste caso, o alinhamento que provocou o aparecimento da duplicação, parece ter sido provocado por uma microhomologia, visto que parte da sequência se repete antes e depois do ponto de quebra (Tabelas Suplementares 10 e 11).

8.3 Caracterização clínica e transmissão do fenótipo na família

O indivíduo com a duplicação no cromossoma 20 é do sexo feminino, tem 13 anos e é caucasiano. O diagnóstico de autismo realizou-se aos 3 anos de idade, com resultados positivos nos testes ADIR e ADOS, sendo o autismo de origem idiopática. Tem uma deficiência mental ligeira, com um QI de 72 e apresenta atrasos a nível da linguagem, tendo desenvolvido a capacidade de formar frases aos 36 meses de idade. Revela também atrasos no desenvolvimento psicomotor, mas apenas a partir dos três anos de idade. Não apresenta alterações a nível neurológico nem problemas visuais ou auditivos. O pai tem um fenótipo normal, mas a mãe apresenta uma perturbação depressiva e revela alguma incapacidade social, de acordo com o teste SRS. Tem, ainda, dois primos paternos com autismo (Tabela 20).

Tabela 20. Informação clínica do indivíduo 8.

Dados clínicos	Indivíduo 8
Diagnóstico	Autismo
Idade de diagnóstico	3 anos
ADIR	Positivo
ADOS	Autismo
QI	Deficiência mental ligeira (72)
Etiologia	Idiopático
Atraso de linguagem	Apresenta atrasos na linguagem
Atraso no desenvolvimento psicomotor	Revelou atraso do desenvolvimento psicomotor, a partir dos três anos de idade
Alterações neurológicas	Não
Problemas visuais ou auditivos	Não
Outros problemas	Não
Medicação	Não
PSP-Q	-
SRS	Mãe: 75; Pai:56
História familiar	A mãe tem perturbação depressiva, mas o pai apresenta um fenótipo normal. Não tem irmãos, mas tem dois primos com autismo.

É possível que a duplicação, além de contribuir para o fenótipo de PEA na criança, possa ter alguma influência na tendência depressiva da mãe e em algumas das outras incapacidades da criança. Mais uma vez, é importante a elaboração do *pedigree*, com uma análise pormenorizada da transmissão do fenótipo na família, visto que o CNV é herdado da mãe (Figura 37).

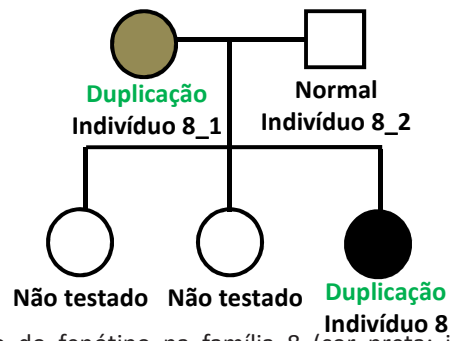


Figura 37. Análise da transmissão do fenótipo na família 8 (cor preta: indivíduo com PEA; cor castanha: indivíduo com perturbação depressiva; os restantes indivíduos apresentam um fenótipo normal).

Como se pode observar no pedigree, a mãe apresenta a perturbação depressiva, o que pode indicar a influência deste CNV no fenótipo de depressão. Além disso, é ainda importante estudar futuramente a presença deste CNV nas irmãs deste indivíduo, apesar de estas serem saudáveis e nos primos, que apresentam o fenótipo autista.

V. DICUSSÃO

Nas crianças com autismo existe uma maior taxa de CNV raros, os quais podem englobar deleções e duplicações, provocando a disrupção de diversos genes. Sendo o principal objectivo deste estudo identificar os CNV raros associados às PEA, é importante fazer uma relação da função biológica dos genes presentes nos CNV com certas características fenotípicas e mecanismos moleculares que possam estar envolvidos no autismo.

No decorrer da validação dos sete CNV estudados, apenas um deles, presente no cromossoma 11q14.3, se revelou ser um falso positivo em dois indivíduos. Neste caso é importante em estudos futuros que sejam utilizados outros métodos de validação para verificar se o CNV está realmente ausente.

No que diz respeito aos CNV que foram validados, em apenas dois deles foi possível sequenciar os pontos de quebra, correspondendo estes à deleção presente no cromossoma 9q31.1 e à duplicação na zona 20p13. É importante que sejam sequenciados os pontos de quebra para que se possa concluir quais são exatamente os genes afetados pelo CNV, sendo por isso necessários que sejam sequenciados os seus pontos de quebra nos CNV em que tal não foi possível.

Com a análise do fenótipo clínico das crianças, concluiu-se que havia uma grande heterogeneidade das PEA, apresentando estas sintomas mais severos, quanto maior é o tamanho do CNV e grande diversidade de sintomas clínicos, com vários níveis de atrasos na linguagem e no desenvolvimento psicomotor e de deficiência mental. A nível familiar, observou-se a transmissão do fenótipo na família em dois dos CNV e alguns familiares de primeiro e segundo grau dos indivíduos autistas apresentam diversos tipos de patologias, como o autismo, esquizofrenia, depressão, entre outros.

Neste estudo, foram identificados e caracterizados CNV presentes em vários locais do genoma e cujo conteúdo genético parece estar associado com a expressão fenotípica de autismo, por vários mecanismos, estando alguns dos genes presentes nos CNV especialmente relacionados com a migração e crescimento neuronal e função sináptica, o que implica que a disrupção destes mecanismos no fenótipo de autismo.

1. Papel do gene *GRIN3A* nos receptores NMDA

No caso do CNV identificado no cromossoma 9, este está presente em apenas numa criança, tendo-se concluído, depois da validação dos pontos de quebras, que este tinha um tamanho de

3,689,861 kb, o que faz com que afete um grande número de genes, presentes na banda 9q31.1. Existem evidências de que se observam CNV nesta zona num caso de autismo, como no estudo de Bremer *et al.* (2010), no qual se observou presença de uma duplicação nesta mesma zona num caso de autismo.

O gene presente neste CNV que parece ser dos mais interessantes para o autismo é o *GRIN3A*, que codifica uma proteína que é uma das subunidades dos recetores N-metil D aspartato (*N-methyl D aspartate receptors*, NMDA). Os recetores NMDA são um dos recetores do glutamato, o maior neurotransmissor excitatório do SNC, o qual está implicado em várias funções mentais, como a aprendizagem e a memória, visto que estão implicados no mecanismo sináptico, o que indica que este seja um ponto de convergência que permite explicar certos défices neurocognitivos, como os que são observados no autismo (Kalia *et al.*, 2008).

Apesar da subunidade NR3A, codificada pelo gene *GRIN3A*, não ser essencial para a maioria dos NMDA, sabe-se que esta subunidade atua como um regulador em certas regiões durante o desenvolvimento nos primeiros anos de vida. Além disso, a subunidade NR3A influencia a densidade das dendrites, a maturação sináptica, a consolidação da memória e a sobrevivência celular, podendo estar envolvida em várias neuropatologias (Figura 38) (Henson *et al.*, 2010; Otano *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2009)

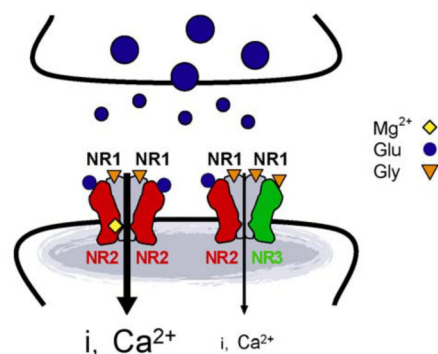


Figura 38. Subunidades constituintes do recetor NMDA, incluindo a NR3, codificada pelo gene *GRIN3A* (adaptada de Henson *et al.*, 2010).

Sendo assim, quando ocorre a sua disrupção do gene *GRIN3A*, o mecanismo regulatório da subunidade NR3 pode ser afetado, o que pode levar a problemas no desenvolvimento do cérebro, uma das regiões onde este gene é expresso. Pode ainda alterar o mecanismo sináptico, visto que este canal é extremamente importante para a transmissão sináptica excitatória.

Também a disrupção de outros genes presentes neste CNV poderá ser importante, devido à sua expressão no cérebro, como o *SLC44A1* e o *SMC2*, apesar de não ter sido encontrada uma relação concreta entre a deleção destes genes e o fenótipo de autismo.

Além disso, na região 9q foi descrito o síndrome de deleção do 9q, no qual podem ocorrer deleções que provocam a interrupção de parte desta região que, muitas vezes, pode também abarcar a banda estudada e cujos principais sintomas são atrasos no desenvolvimento e outros dismorfismos, podendo por vezes ser observada uma redução do volume do cérebro (Kulharya *et al.*, 2008).

A criança na qual este CNV está presente corresponde a um caso de autismo menos grave, designado Síndrome de *Asperger* e no qual não são observadas outras características fenotípicas associadas ao autismo. É provável que este CNV seja patogénico para a criança, não só pelos argumentos referidos, como também pelo fato de aparecer *de novo*, que é um dos critérios para considerar um CNV patogénico, segundo Hannes *et al.* (2009), sendo outro critério a segregação com traços autistas.

2. Relevância dos genes *NDE1* e *NTNA1* para o autismo

Foram descritos dois pacientes com deleções no cromossoma 16, as quais apresentam tamanhos diferentes, tendo o CNV do individuo 6 um tamanho de 1,536,281 kb e o do individuo 7, 1,583,026 kb de tamanho, de acordo com a sua identificação, com base em SNP, no rastreio genómico de indivíduos autistas efetuado pelo AGP. Ambos os CNV provocam a deleção da banda 16p13.11, mas o do individuo 7, sendo um pouco maior, ocorrendo a deleção de parte da banda 16p13.12. Ambos os CNV provocam a interrupção dos genes *NTNA1* e *NDE1*, os quais já foram previamente identificados como sendo genes candidatos para o autismo.

Como já foi referido, os pontos de quebra estão ladeados por regiões contendo LCR, o que significa que foi o mecanismo de recombinação homóloga não alélica entre os LCR que mediou estes rearranjos genómicos. Os LCR correspondem a duplicações de segmentos de DNA com um tamanho superior a 1 kb e mais de 90% de identidade da sequência igual e sabe-se que o cromossoma 16 é especialmente rico neste tipo de rearranjos genómicos, como se comprovou no estudo de Martin *et al.* (2004) em que uma análise detalhada do cromossoma 16 revelou que 9,89% deste cromossoma é constituído por este tipo de rearranjos genómicos.

Os LCR podem ou não estar organizados em tandem e em regiões intercromossómicas ou intracromossómicas (Horvath *et al.*, 2000). Com uma análise detalhada dos CNV estudados e das regiões que delimitam proximal e distalmente estes CNV, conclui-se que existem vários LCR localizados no interior do cromossoma 16, sendo alguns deles em tandem e estes parecem ter sido responsáveis pelas deleções presentes no cromossoma 16 nos indivíduos 6 e 7, visto que estão presentes ao longo da possível localização dos pontos de quebra deste CNV.

Segundo vários estudos, sabe-se que deleções neste *locus* (16p13.11) são patogénicas para várias doenças, entre as quais a deficiência mental e a epilepsia, mas até a data, apenas as duplicações parecem estar associadas a casos de autismo (Ullmann *et al.*, 2007; Hannes *et al.*, 2009). Depois de observados os rearranjos genómicos no *locus* 16p13.11 é um pouco difícil tirar conclusões, visto que apesar das deleções serem relativamente parecidas e provocaram a disrupção de praticamente os mesmos genes em ambos os casos, as crianças apresentam fenótipos clínicos um pouco diferentes.

Mas, tendo em conta que um dos critérios para considerar os CNV patogénicos, segundo Hannes *et al.* (2009) é estes aparecerem *de novo*, corresponde os que são herdados a variantes benignas, talvez devido à existência de algum mecanismo que regula o efeito disruptivo do CNV, pode-se concluir que apenas um dos CNV estudados tenha um papel patogénico. Como já foi referido, num dos casos (família 6) a deleção aparece de novo, enquanto que no outro (família 7) a deleção é herdado da mãe, cujo fenótipo é aparentemente normal, sendo uma das possíveis interpretações destes resultados é que esta deleção corresponda a uma variante benigna para a criança que herda o CNV da mãe e seja uma variante patogénica para a criança na qual o CNV aparece de novo, a qual apresenta uma deficiência mental ligeira. No caso da deleção ser patológica em ambos os indivíduos, o seu efeito pode ser modulado por outros genes, condicionando a sua penetrância, o que faz com que o fenótipo não se manifeste no caso da mãe (Indivíduo 7_1).

Apesar disso, este CNV provoca a disrupção de vários genes, entre os quais, dois genes que parecem ser relevantes para o fenótipo neurocognitivo e por isso serem bons genes candidatos, como o *NTAN1* e o *NDE1*, cujas funções revelam a sua importância a nível neuro cognitivo.

No que diz respeito ao gene *NTAN1*, que faz parte do complexo dependente da ubiquitina, além de já ter sido relacionado com o comportamento social, aprendizagem e memória, capacidades que se encontram afectadas nos pacientes com autismo (Kwon *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2003).

Também o gene *NDE1*, que é expresso no cérebro e importante para o desenvolvimento do córtex cerebral e produção e migração de neurónios, parece ser importante. Este gene codifica uma proteína que está localizada no centróssoma e interage com outros componentes, fazendo parte do complexo multiproteico que inclui a proteína *LIS1*, que regula a função da dineína. Num estudo de modelos animais realizado por Feng & Walsh (2004), observou-se que a deleção deste gene produz o fenótipo de microcefalia, a qual afeta, especialmente, o córtex cerebral e observa-se uma menor espessura das camadas corticais, tendo estas um menor número de neurónios. Dada a importância destes genes no SNC é provável que a sua deleção esteja na base de alguns dos sintomas associados ao autismo.

Concluindo, foram descritas duas deleções no cromossoma 16p13.11, com um tamanho superior a 1,5 kb em ambos os casos, que parece aumentar a predisposição para o autismo nas duas

crianças e contribuir para o fenótipo mais acentuados, com a existência de deficiência mental, quando aparece *de novo*. O facto da mãe que tem esta deleção não apresentar nenhum problema neurocognitivo pode estar relacionado com um mecanismo de imprinting genómico, que impede que o fenótipo se manifeste. De acordo com os argumentos supracitados, pode-se concluir que existe uma grande associação desta deleção com doenças do neurodesenvolvimento, como é o caso do autismo, sendo o espectro clínico associado extremamente variável .

3. Importância do canal de sódio Nav1.9 na transmissão sináptica

No que diz respeito à duplicação presente no cromossoma 3p22.1-22.2, foi descrito apenas um indivíduo com esta duplicação, sendo esta herdada do pai. De todos os CNV estudados, este é o que está presente na criança com um fenótipo de autismo mais grave, sendo observados atrasos da linguagem e do neurodesenvolvimento, deficiência mental, revelando ainda alterações neurológicas a nível do hipocampo. Esta é também a criança cuja história familiar é mais acentuada, visto que tem um irmão com autismo, apresentado o outro irmão e o pai o fenótipo de esquizofrenia, o que torna fundamental estudar estes CNV em ambos os irmãos futuramente. Além disso, este foi o CNV estudado com um maior tamanho, o qual corresponde a 3,683,498 kb, na criança e no pai, no qual estão presentes genes que parecem ser importantes para a etiologia do autismo, entre os quais o *SLC25A38*, *CX3CR1*, *WDR48*, *SCN10A*, *SCN11A* e *MOBP*. Apesar de todos os genes referidos serem expressos no sistema nervoso, o que parece ter uma contribuição mais importante para o desenvolvimento do fenótipo de autismo na criança é o *SCN11A*.

A sua importância deve-se ao facto do gene *SCN11A* codificar a proteína Nav1.9, que é um canal de sódio, que está na base do mecanismo de excitação das neurotrofinas, por ativação dos recetores da tirosina cinase (*Tirosine Kinase receptors*, TRKB), como foi demonstrado no estudo de Blum *et al.* (2002). Este mecanismo é de extrema importância, visto que existem evidências de que as neurotrofinas estejam envolvidas na função sináptica e plasticidade e desenvolvimento neuronal, regulando o crescimento, sobrevivência e diferenciação dos neurónios do SNC.

Apesar deste mecanismo ainda não ter sido bem descrito, sabe-se que na sua base está a ligação dos *BDNF* (*Brain derived neurotrophic factor*) aos recetores TRKB, permitindo a sua activação. Por sua vez, o complexo TRKB/BDNF activa o canal de sódio Nav1.9, o que provoca uma despolarização da membrana, a qual activa outro canal, que induz o influxo de cálcio (Figura 39) (Blum *et al.*, 2002; Blum & Konnerth, 2005).

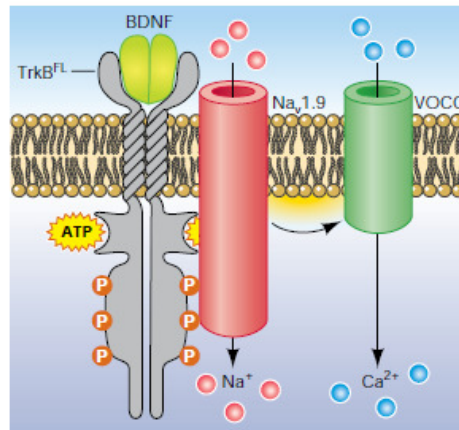


Figura 39. Mecanismo de ativação do canal Nav1.9 pelo BDNF (Adaptado de Blum R e Konnerth A, 2005).

A duplicação do gene *SCN11A*, que codifica o canal de sódio Nav1.9 pode provocar uma desregulação deste canal de sódio, o que pode fazer com que haja uma desregulação de todo o mecanismo de transmissão sináptico mediado pelo complexo TRKB/BDNF.

Além disso, é sugerido em vários estudos que o BDNF, uma neurotrofina fundamental para o desenvolvimento e função do cérebro, se encontra implicada na etiologia das PEA, como o de Correia *et al.* (2010), no qual foram identificados valores séricos mais elevados da neurotrofina BDNF em crianças autistas e com deficiência mental, quando comparadas com controlos, o que também já foi referido em vários outros estudos. Também no cérebro de pacientes com esquizofrenia, são observados elevados níveis de BDNF, especificamente no cortex cerebral e no hipocampo, encontrando-se a expressão do receptor TRKB reduzida nos mesmos locais, o que sugere que estas modificações poderão estar associadas ao fenótipo de esquizofrenia (Takahashi *et al.*, 2000).

O fato de problemas relacionados com o complexo TRKB/BDNF serem observados em pacientes com autismo e esquizofrenia permite formular a hipótese de que a disrupção do canal de sódio Nav1.9 possa provocar uma desregulação de todo este mecanismo, o que pode corresponder a uma base molecular os sintomas observados nos pacientes com autismo e esquizofrenia, nos quais está presente o CNV.

4. Papel das moléculas de adesão na transmissão sináptica

Foi identificada, também, uma duplicação no cromossoma 20, herdada da mãe, com um tamanho de 750,640 kb, que induz a duplicação de vários genes, entre os quais o *PDYN*, *TGM6* e *SIRPA*, que são ambos expressos no SNC. Os seus familiares não revelam problemas a nível do neurodesenvolvimento, exceto dois primos, que são autistas.

O gene cuja função parece ser mais importante corresponde ao *SIRPA*, que codifica uma proteína adesiva, que está envolvida no mecanismo de sinalização sináptica no hipocampo, mediado pelo recetores da tirosina cinase. Este está presente nas células mieloides e interage com a proteína membranar *CD47*, à qual se liga, o que permite que continue o mecanismo de transmissão sináptica (Barclay, 2009; Jiang *et al.*, 1999). A duplicação do gene *SIRPA* pode alterar a conformação da proteína codificada por ele impedindo esta interação, o que pode ter influência no mecanismo de transmissão sináptica.

Além disso, este CNV foi já identificado em indivíduos com autismo por Pinto *et al.*, (2010), outro dos argumentos que indica que este CNV deverá ser importante para o fenótipo de PEA.

A nível clínico, a criança revela o fenótipo de autismo, com atrasos no desenvolvimento psicomotor e da linguagem, o que pode estar relacionado com a disrupção do gene *SIRPA*, devido aos argumentos já referidos. Defeitos a nível de certos mediadores do mecanismo sináptico, como é o caso desta proteína de adesão, pode levar à disrupção sináptica, o que pode estar envolvido no fenótipo de autismo. Apesar do CNV ser herdado da mãe, esta não apresenta perturbações a nível do neurodesenvolvimento, apenas manifesta o fenótipo depressivo, com o qual não foi encontrada qualquer tipo de ligação com este CNV. No que diz respeito aos primeiros paternos com autismo, é possível que estes tenham este ou outro CNV, que também possa estar presente no indivíduo estudado. É por isso importante verificar futuramente se este CNV está presente nestes membros da família, de maneira a constar a sua revelância etiológica para ambos.

5. Controlo da fagocitose na apoptose neuronal pelo gene *ANXA1*

Este CNV está presente em vários indivíduos com autismo e, por isso, considerou-se importante fazer o seu rastreio populacional em casos e controlos que não foram genotipados, tendo-se identificado um outro indivíduo no qual estava presente este CNV, sendo o mesmo herdado da mãe. Este corresponde a uma duplicação do gene *ANXA1* e o seu tamanho corresponde a 7,726 kb, sendo aquele com um tamanho mais reduzido entre os CNV estudados. Este indivíduo foi diagnosticado com autismo, manifestando atrasos de linguagem e no desenvolvimento psicomotor.

As funções mais importantes do gene *ANXA1* são o controlo da fagocitose nos neurónios apoptóticos e a ativação do mecanismo anti-inflamatório mediado pelos micróglia, o qual pode ter um papel de protecção dos neurónios (McArthur *et al.*, 2010). As funções deste gene leva a que ele possa ser considerado um bom gene candidato, visto que, quando ocorre a sua disrupção, é possível que estes mecanismos sejam afetados, podendo ser promovida, por exemplo, a apoptose de um

maior número de neurónios, o que pode estar na base do fenótipo de PEA bem como dos atrasos de linguagem e no desenvolvimento psicomotor se forem afetados os neurónios presentes em áreas cerebrais que controlam estas funcionalidades

O gene *ANXA1* pode estar ainda relacionado com a regulação da pituitária, a qual faz parte do sistema límbico e controla as emoções e interações sociais, o que revela a sua importância em casos de autismo, visto que, se este mecanismo estiver desregulado, pode provocar atrasos nas capacidades referidas, o que se observa em crianças autistas (Buckingham *et al.*, 2006).

Além disso, foram identificados vários indivíduos autistas, com este CNV na população portuguesa, o que denota, também, a sua importância para o autismo, apesar do seu tamanho reduzido. O CNV é herdado da mãe, como já foi referido e o fato desta apresentar um fenótipo normal, pode ser devido a um mecanismo regulatório, que permite que não seja manifestado o efeito da duplicação deste gene.

VI. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar da existência das evidências acrescidas do envolvimento de CNV nas doenças neurológicas, psiquiátricas e do desenvolvimento, incluindo o autismo, pouco se sabe ainda acerca dos mecanismos que aumentam a suscetibilidade para este tipo de doenças, sendo por isso importante que se continue a estudar estas variantes estruturais, bem como as características fenotípicas associadas.

No decorrer deste trabalho, pretendeu-se fazer a identificação de vários CNV raros e patogénicos que pudessem estar associados ao fenótipo das PEA em cada uma das crianças estudadas. Depois de estudados geneticamente os CNV com uma maior probabilidade de serem patogénicos, a função biológica de cada um dos genes foi estudada, com o objectivo de elucidar melhor certos mecanismos que poderão estar na base das características fenotípicas de cada uma das crianças.

Concluiu-se que a maioria dos CNV estudados provocava uma disrupção de genes que codificavam elementos envolvidos no mecanismo sináptico, o que revela a importância deste mecanismo para o autismo, bem como outras características fenotípicas associadas. Apesar disso, é complicado fazer uma ligação concreta entre a deleção ou duplicação de certos genes e a característica fenotípica exata associada, devido à elevada complexidade das PEA e da quantidade de mecanismos que poderão estar a atuar em conjunto. Apesar disso, o estudo de outros pacientes que tenham estes mesmos CNV é importante para que se possa fazer uma comparação das características fenotípicas

Futuramente e com o desenvolvimento de novas técnicas de sequenciação, tornar-se-à mais fácil e rápida a sequenciação de todo o genoma de indivíduos afetados, o que permitirá identificar um maior número de genes associados às PEA e quais os mecanismos envolvidos nesta patologia, o que poderá levar à descoberta de possíveis alvos terapêuticos para a elaboração de novos medicamentos (Abrahams & Geschwind, 2008).

O desenvolvimento de um teste genético que possa estar envolvido no diagnóstico de autismo poderá ser alcançado, com a caracterização dos CNV em vários pacientes autistas e a sua inserção em plataformas informativas e bases de dados, havendo partilha de resultados entre os diversos laboratórios de diagnóstico e investigação. Apesar disso, nesta fase, esta hipótese ainda parecer é um pouco remota, devido à elevada complexidade do autismo, sendo apenas possível identificar CNV patogénicos em cada indivíduo, que em conjunto poderão contribuir para o fenótipo global das PEA.

VII. Referencias bibliograficas

- Abrahams, B. S. & Geschwind, D. H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* **9(5)**, 341–355 (2008).
- Abrahams, B. S. & Geschwind, D. H. Connecting Genes to Brain in the Autism Spectrum Disorders. *Arch. Neurol.* **67(4)**, 395-399 (2010).
- Akshoomoff, N., Pierce, K. & Courchesne, E. The neurobiological basis of autism from a developmental perspective. *Dev. Psychopathol.* **14**, 613-634 (2002).
- Alarcon, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., Nelson, S. F., Cantor, R. M. & Geschwind, D. H. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 150–159 (2008).
- Albertson, D. G. & Pinkel, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.* **12**, R145–R152 (2003).
- Amaral, D. G., Schumann, C. M. & Nordahl, C. W. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci* **31 (3)**, 137-145 (2008).
- American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV-TR*. Fourth Edition. Washington DC. American Psychiatric Association. 2000.
- Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A. & Euler, G. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* **78**, 178-184 (2001).
- Asperger, H., & Frith, U. *Autistic psychopathy in childhood*. First Edition. New York. Cambridge University Press. 1991.
- Auranen, M., Vanhala, R., Varilo, T., Ayers, K., Kempas, E., Ylisaukkoja, T., Sinsheimer, J. S., Peltonen, L. & Jarvela, I. A Genomewide Screen for Autism-Spectrum Disorders: Evidence for a Major Susceptibility Locus on Chromosome 3q25-27. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 777–790 (2002).
- Bacchelli, E. & Maestrini, E. Autism Spectrum Disorders: Molecular Genetic Advances. *Am. J. Med. Gen.* **142(C)**, 13–23 (2006).
- Bakalkin, G., Watanabe, H., Jezierska, J., Depoorter, C., Verschuuren-Bemelmans, C., Bazov, I., Artemenko, K. A., Yakovleva, T., Dooijes, D., Van de Warrenburg, B. P. C., Zubarev, R. A., Kremer, B., Knapp, P. E., Hauser, K. F., Wijmenga, C., Nyberg, F., Sinke, R. J. & Verbeek, D. S. Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 593-603 (2010).
- Bakircioglu, M., Carvalho, O. P., Khurshid, M., Cox, J. J., Tuysuz, B., Barak, T., Yilmaz, S., Caglayan, O., Dincer, A., Nicholas, A. K., Quarrell, O. & Springell, K. The essential role of centrosomal NDE1 in human cerebral cortex neurogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 523-535 (2011).
- Barclay, A.N. Signal regulatory protein alfa (SIRPa)/CD47 interaction and function. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 47–52 (2009).
- Battaglia, A. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev.* **27**, 365– 369 (2005).
- Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. *Neuroscience: exploring the brain*. Third Edition. EUA. Lippincott Williams e Wilkins, 2007.
- Betancur, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* **1380**, 42-77 (2011).
- Blum, R., Kafitz, K. W. & Konnerth, A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V). *Nature* **419**, 687-693 (2002).
- Blum, R. & Konnerth A. Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. *Physiology* **20**, 70–78 (2005).
- Bolton, P., Macdonald, H., Pickles, A., Rios, P., Goode, S., Crowson, M., Bailey, A. & Rutter, M. A case-control family history study of autism. *J. Child Psychol. Psychiat.* **35**, 877–900 (1994).
- Bremer, A., Giacobini, M., Eriksson, M., Gustavsson, P., Nordin, V., Fernell, E., Gillberg, C., Nordgren, A., Uppstromer, A., Anderlid, BM., Nordenskjold, M. & Schoumans, J. Copy Number Variation Characteristics in Subpopulations of Patients With Autism Spectrum Disorders. *Am. J. Med. Genet. Part B* **156**, 115–124 (2011).
- Buckingham, J. C., John, C. D., Solito, E., Tierney, T., Flower, R. J., Christian, H. & Morris, J. Annexin 1, Glucocorticoids, and the Neuroendocrine–Immune Interface. *Ann. N Y. Acad. Sci.* **1088**, 396–409 (2006).
- Burbach, J. P. H. & Zwaag, B. Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci.* **32(2)**, 69-72 (2009).

- Buxbaum, J. D., Silverman, J. M., Smith, C. J., Greenberg, D. A., Kilifarski, M., Reichert, J., Cook, E. H., Fang, Y., Song, C. Y. & Vitale, R. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol. Psychiatry* **7**, 311–316 (2002).
- Buxbaum, J. D., Cohen, S. B. & Devlin, B. Genetics in psychiatry: common variant association studies. *Mol Autism* **1(6)**, 1-4 (2010).
- Caglayan, A. O. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev. Med. Child Neurol.* **52(2)**, 130-138 (2010).
- Campbell, D. B., D’Oronzio, R., Garbett, K., Ebert, P. J., Mirnics, K., Levitt, P. & Persico, A. M. Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Ann. Neurol.* **62**, 243–250 (2007).
- Cantor, R. M., Kono, N., Duvall, J. A., Retuerto, A. A., Stone, J. L., Alarcon, M., Nelson, S. F. & Geschwind, D. H. Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 1050–1056 (2005).
- Castermans, D., Wilquet, V., Steyaert, J., Vem, W., Fryns, J. P. & Devriendt, K. Chromosomal anomalies in individuals with autism: A strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism* **8**, 141-161 (2004).
- Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA* **21**, 3093–3099 (2001).
- Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1133–1141 (2005).
- Challman, T. D., Barbaresi, W. J., Katusic, S. K. & Weaver, A. The Yield of the Medical Evaluation of Children with Pervasive Developmental Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **33 (2)**, 187-192 (2003).
- Charman, T. Autism spectrum disorders. *Psychiatry* **7 (8)**, 331-334 (2008).
- Cheung, C., Yu, K., Fung, G., Leung, M., Wong, C., Li, Q., Sham, P., Chua, S. & McAlonnan, G. Autistic Disorders and Schizophrenia: Related or Remote? An Anatomical Likelihood Estimation. *PLoS ONE* **5(8)**, e12233 (2010).
- Constantino, J. N., Davis, S. A., Todd, R. D., Schindler, M. K., Gross, M. M., Brophy, S. L., Metzger, L. M., Shoushtari, C. S., Splinter, R. & Reich, W. Validation of a Brief Quantitative Measure of Autistic Traits: Comparison of the Social Responsiveness Scale with the Autism Diagnostic Interview-Revised. *J. Autism Dev. Disord.* **33 (4)**, 427-433 (2003).
- Cook, E. H. & Scherer, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* **455**, 919-923 (2008).
- Correia, C. T., Coutinho, A. M., Sequeira, A. F., Sousa, I. G., Lourenço, V. L., Almeida, J. P., Abreu, R. L., Lobo, C., Miguel, T. S., Conroy, J., Cochrane, L., Gallagher, L., Gill, M., Ennis, S., Oliveira, G. G., Vicente, A. M. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav.* **9(7)**, 841-848 (2010).
- Courchesne, E., Carper R & Akshoomoff N. Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA* **290**, 337–344 (2003).
- Cruz, M. WISC III: Escala de Inteligência Weschsler para crianças: manual. *Avaliação Psicológica* **4(2)**, 199-201 (2005).
- Daniels, J. L. Autism and the Environment. *Environ. Health Perspectives* **114(7)**, 1-1 (2006).
- D’haene, B., Vandesompele, J. & Hellems, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* **50**, 262–270 (2010).
- D’Hulst, C. & Kooy, R. F. Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy *J. Med. Genet.* **46**, 577-584 (2009).
- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Black, J. A. & Waxman, S. G. NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**, 8963-8968 (1998).
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., Fombonne, E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res.* **5(3)**, 160-79 (2012).
- Emerson, E. & Hatton, C. Mental health of children and adolescents with intellectual disabilities in Britain. *BJP* **191**, 493-499 (2007).
- Emerson, E., Hatton, C., Dickson, K., Gone, R., Caine, A. & Bromley, J. *Clinical Psychology and people with intellectual disabilities*. Second Edition. United Kingdom. John Wiley and sons. 2012.
- Feng, Y. & Walsh, C. A. Mitotic Spindle Regulation by *Nde1* Controls Cerebral Cortical Size. *Neuron* **44**, 279–293 (2004).

- Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 85–97 (2006).
- Folstein, S., & Rutter, M. Infantile autism: A genetic study of 21 pairs. *J. Child Psychol. Psychiat.* **18**, 297–321 (1977).
- Fombonne, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J. Clin. Psychiatry* **66(10)**, 3–8 (2005).
- Frazer, K. A., Murray, S. S., Schork, N. J. & Topo, E. J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat. Rev. Gen.* **10**, 241-251 (2009)
- Freeman, J. L., Perry, G. H., Feuk, L., Redon, R., McCarroll, S. A., Altshuler, D. M., Aburatani, H., Jones, K. W., Tyler-Smith, C., Hurles, M. E., Carter, N. P., Scherer, S. W. & Lee, C. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Res.* **16**, 949–961 (2006).
- Freitag, C. M., Staal, W., Klauck, S. M., Duketis, E. & Waltes, R. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **19**, 169-178 (2010).
- Gai, X., Xie, H. M., Perin, J. C., Takahashi, N., Murphy, K., Wenocur, A. S., D’arcy, M., O’Hara, R. J., Goldmuntz, E., Grice, D. E., Shaikh, T. H., Hakonarson, H., Buxbaum, J. D., Elia, J. & White, P. S. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol. Psychiatry*, 1-10 (2011).
- Galasso, C., LoCastro, A., Lalli, C., Nardone, A. M., Gullotta, F. & Curatolo, P. Deletion 2q37: An Identifiable Clinical Syndrome With Mental Retardation and Autism. *J. Child Neurol.* **23**, 802-806 (2008).
- Geschwind, D. H. Many Genes, Common Pathways? *Cell* **135**, 391-395 (2008).
- Geschwind, D. H. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn. Sci.* **15(9)**, 409-416 (2011).
- Griffiths, R. *The abilities of young children*. First Edition. London. Child Development Research Centre. 1970.
- Griffiths, R. *The abilities of young children: A Comprehensive System of Mental Measurement for the First Eight Years of Life*. First Edition. Amersham. Association for Research in Infant and Child Development. 1984.
- Gu, W., Zhang, F. & Lupski, J. R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics* **1(4)**, 1-17 (2008).
- Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T. & Fredriksson, R. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* **88**, 779-790 (2006).
- Hannes, F. D., Sharp, A. J., Mefford, H. C., Ravel, T., Ruivenkamp, C. A., Breuning, M. H., Fryns, J. P., Devriendt, K., Buggenhout, G. V., Vogels, A., Stewart, H., Hennekam, R. C., Cooper, G. M., Regan, R., Knight, S. J. L., Eichler, E. E. & Vermeesch, J. R. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J. Med. Genet.* **46**, 223–232 (2009).
- Hefferina, M. L. & Tomkinson, A. E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair* **4**, 639–648 (2005).
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Otano, I. P. & Philpot, B. D. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* **91**, 23–37 (2010).
- Horikawa, S., Takai, T., Toyosato, M., Takahashi, H., Noda, M., Kakidani, H., Kubo, T., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., Numa, S. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature* **306**, 611-614 (1983).
- Horvath, J. E., Schwartz, S. & Eichler, E. E. The Mosaic Structure of Human Pericentromeric DNA: A Strategy for Characterizing Complex Regions of the Human Genome. *Genome Res.* **10**, 839-852 (2000).
- Hoshino, Y., Yashima, Y., Ishige, K., Tachibana, R., Watanabe, M., Kancki, M., Kumashiro, H., Ueno, B., Takahashi, E., & Furukawa, H. The epidemiological study of autism in FukushimaKen. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.* **36**, 115–124 (1982).
- Hurley, R. S. E., Losh, M., Parlier, M., Reznick, J. S. & Piven, J. The Broad Autism Phenotype Questionnaire. *J. Autism Dev. Disord.* **37**, 1679–1690 (2007).
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). A genomewide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 570–581 (2001).
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L. L., Fulton, R. S., Magrini, V. J., Ye, K., Darnell, J. C., Darnell, R. B., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Schatz, M. C., McCombie, W. R. & Wigler, M. De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* **74(2)**, 285-299 (2012).

- Jacquemont, M. L., Sanlaville, D., Redon, R., Raoul, O., Daire, V. C., Lyonnet, S., Amiel, J., Merrer, M. L., Heron, D., Blois, M. C., Prieur, M., Vekemans, M., Carter, N. P., Munnich, A., Collea, L. & Philippe, A. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J. Med. Genet.* **43**, 843–849 (2006).
- Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., Philippe, A., Fellous, M., Giros, B., Gillberg, C., Leboyer, M., Bourgeron, T. & Paris Autism Research International Sibpair Study. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol. Psychiatry* **7**, 302–310 (2002).
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Söderström, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T. & Paris Autism Research International Sibpair Study. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genet.* **34**, 27–29 (2003).
- Jiang, P., Lagenaur, C. F. & Narayanan, V. Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule. *J. Biol. Chemistry* **274**(2), 559–562 (1999).
- Jockschat, T. N. & Michel T. M. The role of neurotrophic factors in autism. *Mol. Psychiatry* **16**, 478–490 (2011).
- Kalia, L. V., Kalia, S. K. & Salter, M. W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* **7**, 742–55 (2008).
- Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* **2**, 217–250 (1943).
- Kelleher, R. J. & Bear, M. F. The Autistic Neuron: Troubled Translation? *Cell* **135**, 401–406 (2008).
- Kelleher, R. J., Geigenmüller, U., Hovhannisyan, H., Trautman, E., Pinard, R., Rathmell, B., Carpenter, R. & Margulies, D. High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PLoS One* **7**(4), e35003 (2012).
- Kilpinen, H., Ylisaukkoja, T., Hennah, W., Palo, O. M., Varilo, T., Vanhala, R., Wendt, T. N., Wendt, L., Paunio, T. & Peltonen, L. Association of DISC1 with autism and Asperger syndrome. *Mol. Psychiatry* **13**, 187–196 (2008).
- Korbel, J. O., Urban, A. E., Grubert, F., Du, J., Royce, T. E., Starr, P., Zhong, G., Emanuel, B. S., Weissman, S. M., Snyder, M. & Gerstein, M. B. Systematic prediction and validation of copy number variants associated with copy-number variants in the human genome. *PNAS* **104**(24), 10110–10115 (2007).
- Kumar, R. A., Mohamed, S. K., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., Badner, J. A., Gilliam, T. C., Nowak, N. J., Cook, E. H., Dobyns, W. B. & Christian, S. L. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum. Mol. Genet.* **17**(4), 628–638 (2008).
- Kumar, R. A. & Christian, S. L. Genetics of Autism Spectrum Disorders. *Curr. Neurol. Neurosc. Reports* **9**, 188–197 (2009).
- Kwon, Y. T., Balogh, S. A., Davydov, I. V., Kashina, A. S., Yoon, J. K., Xie, Y., Gaur, A., Hyde, L., Denenberg, V. H. & Varshavsky, A. Altered activity, social behavior, and spatial memory in mice lacking the NTAN1p amidase and the asparagine branch of the N-end rule pathway. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4135–48 (2000).
- Lahiri, D. K. & Nurnberger, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* **19**(19), 5444–5444 (1991).
- Lee, J. A. & Lupski, J. R. Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* **52** (1), 103–121 (2006).
- Lee, J. A., Carvalho, C. M. B. & Lupski, J. R. A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders. *Cell* **131**, 1235–1247 (2007).
- Lerer, E., Levi, S., Salomon, S., Darvasi, A., Yirmiya, N. & Ebstein, R. P. Association between the oxytocin receptor (*OXTR*) gene and autism: relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition. *Mol. Psychiatry* **13**, 980–988 (2008).
- Leyfer, O. T., Folstein, S. E., Bacalman, S., Davis, N. O., Dinh, E., Morgan, J., Flusberg, H. T. & Lainhart, J. E. Comorbid Psychiatric Disorders in Children with Autism: Interview Development and Rates of Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **36**, 849–861 (2006).
- Lintas, C. & Persico, A. M. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J. Med. Genet.* **46**, 1–8 (2009).
- London, E. & Etzel, R. A. The Environment as an Etiologic Factor in Autism: A New Direction for Research. *Environ. Health Perspect.* **108**(suppl 3), 401–404 (2000).
- Lord, C., Rutter, M. & Couteur, A. Autism diagnostic interview—revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Develop. Disord.* **24**, 659–685 (1994).

Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, E., Leventhal, B., DiLavore, P., Pickles, A. & Rutter, M. The autism diagnostic observation schedule—generic: A standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J. Autism Develop. Disord.* **30**, 205–223 (2000).

Lord, C. & Bishop, S. L. Autism Spectrum Disorders Diagnosis, Prevalence, and Services for Children and Families. *Social Policy Rep.* **24(2)**, 1-27 (2010).

Lupski, J. R. Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome Biology* **5**, 242 (2004).

Martin, J., Han, C., Gordon, L. A., Terry, A., Prabhakar, S., She, X., Xie, G., Hellsten, U., Chan, Y. M., Altherr, M., Couronne, O., Aerts, A., Bajorek, E., Black, S., Blumer, H., Branscomb, E., Brown, N. C., Bruno, W. J., Buckingham, J. M., Callen, D. F., Campbell, C. S., Campbell, M. L., Campbell, E. W., Caoile, C., Challacombe, J. F., Chasteen, L. A., Chertkov, O., Chi, H. C., Christensen, M., Clark, L. M., Cohn, J. D., Denys, M., Detter, J. C., Dickson, M., Bussod, M. D., Escobar, J., Fawcett, J. J., Flowers, D., Fotopulos, D., Glavina, T., Gomez, M., Gonzales, E., Goodstein, D., Goodwin, L. A., Grady, D. L., Grigoriev, I., Groza, M., Hammon, N., Hawkins, T., Haydu, L., Hildebrand, C. E., Huang, W., Israni, S., Jett, J., Jewett, P. B., Kadner, K., Kimball, H., Kobayashi, A., Krawczyk, M. C., Leyba, T., Longmire, J. L., Lopez, F., Lou, Y., Lowry, S., Ludeman, T., Manohar, C. F., Mark, G. A., McMurray, K. L., Meincke, L. J., Morgan, J., Moyzis, R. K., Mundt, M. O., Munk, A. C., Nandkeshwar, R. D., Pitluck, S., Pollard, M., Predki, P., Quintana, B. P., Ramirez, L., Rash, S., Retterer, J., Rieke, D. O., Robinson, D. L., Rodriguez, A., Salamov, A., Saunders, E. H., Scott, D., Shough, T., Stallings, R. L., Stalvey, M., Sutherland, R. D., Tapia, R., Tesmer, J. G., Thayer, N., Thompson, L. S., Tice, H., Torney, D. C., Gyamfi, M. T., Tsai, M., Ulanovsky, L. E., Ustaszewska, A., Vo, N., White, P. S., Williams, A. L., Wills, P. L., Wu, J. R., Wu, K., Yang, J., DeJong, P., Bruce, D., Doggett, N. A., Deaven, L., Schmutz, J., Grimwood, J., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Eichler, E. E., Gilna, P., Lucas, S. M., Myers, R. M., Rubin, E. M. & Pennacchio, L. A. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature* **432**, 988-994 (2004).

Matson, J. L. & Nebel-Schwalm, M. S. Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview *Res Develop Disabilities* **28**, 341-352 (2007).

McArthur, S., Cristante, E., Paterno, M., Christian, H., Roncaroli, F., Gillies, G. E. & Solito, E. Annexin A1: A Central Player in the Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Microglia. *J. Immunol.* **185(10)**, 6317–6328 (2010).

McCarthy, M. I., Abecasis, G. R., Cardon, L. R., Goldstein, D. B., Little, J., Ioannidis, J. P. A., Hirschhorn, J. N. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature* **9**, 356 – 369 (2008).

McCarthy, S. E., Makarov, V., Kirov, G., Addington, A. M., McClellan, J., Yoon, S., Perkins, D. O., Dickel, D. E., Kusenda, M., Krastoshevsky, O., Krause, V., Kumar, R. A., Grozeva, D., Malhotra, D., Walsh, T., Zackai, E. H., Kaplan, P., Ganesh, J., Krantz, I. D., Spinner, N. B., Roccanova, P., Bhandari, A., Pavon, K., Lakshmi, B., Leotta, A., Kendall, J., Lee, Y., Vacic, V., Gary, S., Iakoucheva, L. M., Crow, T. J., Christian, S. L., Lieberman, J. A., Stroup, T. S., Lehtimäki, T., Puura, K., Englert, C. H., Pearl, J., Goodell, M., Willour, V. L., DeRosse, P., Steele, J., Kassem, L., Wolff, J., Chitkara, N., McMahon, F. J., Malhotra, A. K., Potash, J. B., Schulze, T. G., Nöthen, M. M., Cichon, S., Rietschel, M., Leibenluft, E., Kustanovich, V., Lajonchere, CM., Sutcliffe, J. S., Skuse, D., Gill, M., Gallagher, L., Mendell, N. R., Craddock, N., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Shaikh, T. H., Susser, E., DeLisi, L. E., Sullivan, P. F., Deutsch, C. K., Rapoport, J., Levy, D. L., King, M. C. & Sebat, J. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nature Genet.* **41**, 1223 – 1227 (2009).

Mefford, H. C., Batshaw, M. L. & Hoffman, E. P. Genomics, Intellectual Disability, and Autism. *N. Engl. J. Med.* **366**, 733-43 (2012).

Miller, D. T., Shen, Y., Weiss, L. A., Korn, J., Anselm, I., Bridgemohan, C., Cox, G. F., Dickinson, H., Gentile, J., Harris, D. J., Hegde, V., Hundley, R., Khwaja, O., Kothare, S., Luedke, C., Nasir, R., Poduri, A., Prasad, K., Raffalli, P., Reinhard, A., Smith, S. E., Sobeih, M. M., Soul, J. S., Stoler, J., Takeoka, M., Tan, W. H., Thakuria, J., Wolff, R., Yusupov, R., Gusella, J. F., Daly, M. J. & Wu, B. L. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet.* **46**, 242–248 (2009).

Minakami, R., Katsuki, F., Yamamoto, T., Nakamura, K., Sugiyama, H. Molecular cloning and the functional expression of two isoforms of human metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1136-1143 (1994).

Mueser, K. T. & McGurk, S. R. Schizophrenia. *Lancet* **363(9426)**, 2063-2072 (2004).

Muhle, R., Trentacoste, S. V. & Rapin, I. The genetics of autism. *Pediatrics* **113**, 472 – 486 (2004).

Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K., Hirosawa, M. & Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **7**, 143-150 (2000).

- NanoDrop. *Technical Support Bulletin*. First Edition. Delaware, USA. NanoDrop Technologies. 2007.
- National Institutes of Mental Health (NIMH). *Autism Spectrum Disorders, Pervasive Developmental Disorders*. Second Edition. U.S. Department of health and human services. 2008.
- Oliveira, G., Ataíde, A., Marques, C., Miguel, T. S., Coutinho, A. M., Mota-Vieira, L., Gonçalves, E., Lopes, N. M., Rodrigues, V., Carmona da Mota, H. & Vicente, A. M. Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Develop. Med. Child Neurol.* **49**, 726–733 (2007).
- O'Regan, S., Traiffort, E., Ruat, M., Cha, N., Compaore, D., Meunier, F. M. An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**, 1835-1840 (2000).
- Otano, I. P., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. & Heinemann, S. F. Assembly with the NR1 Subunit Is Required for Surface Expression of NR3A-Containing NMDA Receptors. *J. Neurosci.* **21(4)**, 1228–1237 (2001).
- Pagnamenta, A. T., Wing, K., Akha, E. S., Knight, S. J. L., Bolte, S., Schmotzer, G., Duketis, E., Poustka, F., Klauck, S. M., Poustka, A., Ragoussis, J., Bailey, A. J., Monaco, A. P. & IMGSAC. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *Eur. J. Hum. Gen.* **17**, 687–692 (2009).
- Pastwa, E. & Błasiak, J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **50(4)**, 891-908 (2003).
- Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T. R., Correia, C., Abrahams, B. S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G. D., Bailey, A. J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bolte, S., Bolton, P. F., Bourgeron, T., Brennan, S., Brian, J., Bryson, S. E., Carson, A. R., Casallo, G., Casey, J., Chung, B. H. Y., Cochrane, L., Corsello, C., Crawford, E. L., Crossett, A., Cytrynbaum, C., Dawson, G., Jonge, M., Delorme, R., Drmic, I., Duketis, E., Duque, F., Estes, A., Farrar, P., Fernandez, B. A., Folstein, S. E., Fombonne, E., Freitag, C. M., Gilbert, J., Gillberg, C., Glessner, J. T., Goldberg, J., Green, A., Green, J., Guter, S. J., Hakonarson, H., Heron, E. A., Hill, M., Holt, R., Howe, J. L., Hughes, G., Hus, V., Iglizoi, R., Kim, C., Klauck, S. M., Kolevzon, A., Korvatska, O., Kustanovich, V., Lajonchere, C. M., Lamb, J. A., Laskawiec, M., Leboyer, M., Couteur, A., Leventhal, B. L., Lionel, A. C., Liu, X. Q., Lord, C., Lotspeich, L., Lund, S. C., Maestrini, E., Mahoney, W., Mantoulan, C., Marshall, C. R., McConachie, H., McDougle, C. J., McGrath, J., McMahon, W. M., Merikangas, A., Migita, O., Minshew, N. J., Mirza, G. K., Munson, J., Nelson, S. F., Noakes, C., Noor, A., Nygren, G., Oliveira, G., Papanikolaou, K., Parr, J. R., Parrini, B., Paton, T., Pickles, A., Pilorge, M., Piven, J., Ponting, C. P., Posey, D. J., Poustka, A., Poustka, F., Prasad, A., Ragoussis, J., Renshaw, K., Rickaby, J., Roberts, W., Roeder, K., Roge, B., Rutter, M. L., Bierut, L. J., Rice, J. P., Salt, J., Sansom, K., Sato, D., Segurado, R., Sequeira, A. F., Senman, L., Shah, N., Sheffield, V. C., Soorya, L., Sousa, I., Stein, O., Sykes, N., Stoppioni, V., Strawbridge, C., Tancredi, R., Tansy, K., Thiruvahindrapduram, B., Thompson, A. P., Thomson, S., Tryfon, A., Tsiantis, J., Engeland, H., Vincent, J. B., Volkmar, F., Wallace, S., Wang, K., Wang, Z., Wassink, T. H., Webber, C., Weksberg, R., Wing, K., Wittmeyer, K., Wood, S., Wu, J., Yaspan, B. L., Zurawiecki, D., Zwaigenbaum, L., Buxbaum, J. D., Cantor, R. M., Cook, E. H., Coon, H., Cuccaro, M. L., Devlin, B., Ennis, S., Gallagher, L., Geschwind, D. H., Gill, M., Haines, J. L., Hallmayer, J., Miller, J., Monaco, A. P., Nurnberger, J. I., Paterson, A. D., Vance, M. A. P., Schellenberg, G. D., Szatmari, P., Vicente, A. M., Vieland, V. J., Wijsman, E. M., Scherer, S. W., Sutcliffe, J. S. & Betancur, C. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466(7304)**, 368–372 (2010).
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., & LaMantia, A. *Neuroscience*. 4ª Edição. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2008.
- Qiu, A., Adler, M., Crocetti, D., Miller, M. I. & Mostofsky, S. H. Basal ganglia shapes predict social, communication, and motor dysfunctions in boys with autism spectrum disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **49(6)**, 539-551 (2010).
- Rabert, D. K., Koch, B. D., Ilnicka, M., Obernolte, R. A., Naylor, S. L., Herman, R. C., Eglon, R. M., Hunter, J. C. & Sangameswaran, L. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain* **78**, 107-114 (1998).
- Raport, C. J., Schweickart, V. L., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Gray, P. W. The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. *Gene* **163**, 295-299 (1995).
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., Fiegler, H., Shaper, M. H., Carson, A. R., Chen, W., Cho, E. K., Dallaire, S., Freeman, J. L., Gonzalez, J. R., Gratacos, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J. R., Marshall, C. R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M. J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Zhang, J., Armengol, L., Conrad, D. F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K.

- W., Scherer, S. W. & Hurles, M. E. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444–454 (2006).
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P. B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D. L., Cavalli-Sforza, L. L., Kraemer, H. C. & Myers, R. M. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am. J. Hum. Gen.* **65**, 493 – 507 (1999).
- Roberts, A. C., Garcia, J. D., Rodriguiz, R. M., Lopez, I. P., Lujan, R., Turrillas, R. M., Pico, E., Henson, M. A., Bernardo, D. R., Jarrett, T. M., Clendeninn, D. J., Mascaraque, L. L., Feng, G., Lo, D. C., Wesseling, J. F., Wetsel, W. C., Philpot, B. D. & Otano, I. P. Downregulation of NR3A-Containing NMDARs Is Required for Synapse Maturation and Memory Consolidation. *Neuron* **63**, 342–356 (2009).
- Rutter, M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J. Autism Develop Disord.* **8(2)**, 139-161 (1978).
- Rutter, M. Genetic Studies of Autism: From the 1970s into the Millennium. *J. Abn. Child Psychol.* **28(1)**, 3–14 (2000).
- Scherer, S. W., Cheung, J., MacDonald, J. R., Osborne, L. R., Nakabayashi, K., Herbrick, J. A., Carson, A. R., Parker-Katirae, L., Skaug, J., Khaja, R., Zhang, J., Hudek, A. K., Li, M., Haddad, M., Duggan, G. E., Fernandez, B. A., Kanematsu, E., Gentles, S., Christopoulos, C. C., Choufani, S., Kwasnicka, D., Zheng, X. H., Lai, Z., Nusskern, D., Zhang, Q., Gu, Z., Lu, F., Zeeman, S., Nowaczyk, M. J., Teshima, I., Chitayat, D., Shuman, C., Weksberg, R., Zackai, E. H., Grebe, T. A., Cox, S. R., Kirkpatrick, S. J., Rahman, N., Friedman, J. M., Heng, H. H. Q., Pelicci, P. G., Lo-Coco, F., Belloni, E., Shaffer, L. G., Pober, B., Morton, C. C., Gusella, J. F., Bruns, G. A. P., Korf, B. R., Quade, B. J., Ligon, A. H., Ferguson, H., Higgins, A. W., Leach, N. T., Herrick, S. R., Lemyre, E., Farra, C. G., Kim, H. G., Summers, A. M., Gripp, K. W., Roberts, W., Szatmari, P., Winsor, E. J. T., Grzeschik, K. H., Teebi, A., Minassian, B. A., Kere, J., Armengol, L., Pujana, M. A., Estivill, X., Wilson, M. D., Koop, B. F., Tosi, S., Moore, G. E., Boright, A. P., Zlotorynski, E., Kerem, B., Kroisel, P. M., Petek, E., Oscier, D. G., Mould, S. J., Döhner, H., Döhner, K., Rommens, J. M., Vincent, J. B., Venter, J. C., Li, P. W., Mural, R. J., Adams, M. D. & Tsui, L. C. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* **300**, 767–772 (2003).
- Schumann, C. M. & Amaral, D. G. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci.* **26(29)**, 7674-7679 (2006).
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., Navin, N., Lucito, R., Healy, J., Hicks, J., Ye, K., Reiner, A., Gilliam, T. C., Trask, B., Patterson, N., Zetterberg, A. & Wigler, M. Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome. *Science* **305**, 525–528 (2004).
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang, R., Lee, Y. H., Hicks, J., Spence, S. J., Lee, A. T., Pura, K., Lehtimäki, T., Ledbetter, D., Gregersen, P. K., Bregman, J., Sutcliffe, J. S., Jobanputra, V., Chung, W., Warburton, D., King, M. C., Skuse, D., Geschwind, D. H., Gilliam, T. C., Ye, K. & Wigler, M. Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science* **316**, 445-451 (2007).
- Segurado, R., Conroy, J., Meally, E., Fitzgerald, M., Gill, M. & Gallagher, L. Confirmation of association between autism and the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene on chromosome 2q31. *Am. J. Psychiatry* **162**, 2182–2184 (2005).
- Serajee, F. J., Zhong, H. & Huq, A. H. M. Association of reelin gene polymorphisms with autism. *Genomics* **87**, 75–83 (2006).
- Sharp, A. J., Mefford, H. C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., Stevenson, R. E., Schroer, R. J., Novara, F., Gregori, M., Ciccone, R., Broomer, A., Casuga, I., Wang, Y., Xiao, C., Barbacioru, C., Gimelli, G., Bernardina, B. D., Torniero, C., Giorda, R., Regan, R., Murday, V., Mansour, S., Fichera, M., Castiglia, L., Failla, P., Ventura, M., Jiang, Z., Cooper, G. M., Knight, S. J. L., Romano, C., Zuffardi, O., Chen, C., Schwartz, C. E. & Eichler, E. E. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat. Genet.* **40**, 322–328 (2008).
- Shaw, C. J. & Lupski, J. R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum. Mol. Gen.* **13(1)**, R57-R64 (2004).
- Stankiewicz, P. & Lupski, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Gen.* **18(2)**, 74-82 (2002).
- Stankiewicz, P. & Lupski, J. R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. *Ann. Rev. Med.* **61**, 437–455 (2010).
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O. P. H., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Vokamp, J. E. B., Hansen, T., Jakobsen, K. D., Muglia, P., Francks, C.,

Matthews, P. M., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Gudbjartsson, D., Thorgeirsson, T. E., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Bjornsson, A., Mattiasdottir, S., Blondal, T., Haraldsson, M., Magnusdottir, B. B., Giegling, I., Moller, H. J., Hartmann, A., Shianna, K. V., Ge, D., Need, A. C., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Henriksson, A. T., Paunio, T., Toulopoulou, T., Bramon, E., Forti, M. D., Murray, R., Ruggeri, M., Vassos, E., Tosato, S., Walshe, M., Li, T., Vasilescu, C., Muhleisen, T. W., Wang, A. G., Ullum, H., Djurovic, S., Melle, I., Olesen, J., Kiemeny, L. A., Franke, B., Sabatti, C., Freimer, N. B., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Andreassen, O. A., Ophoff, R. A., Georgi, A., Rietschel, M., Werge, T., Petursson, H., Goldstein, D. B., Nothen, M. M., Peltonen, L., Collier, D. A., Clair, D. & Stefansson, K. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* **455**, 232–236 (2008).

Steinhausen, H. C., Gobel, D., Breinlinger, M. & Wohlleben, B. A Community Survey of Infantile Autism. *J. Am. Acad. Child Psychiatry* **2**, 186–189 (1986).

Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X. Q., Vincent, J. B., Skaug, J. L., Thompson, A. P., Senman, L., Feuk, L., Qian, C., Bryson, S. E., Jones, M. B., Marshall, C. R., Scherer, S. W., Vieland, V. J., Bartlett, C., Mangin, L. V., Goedken, R., Segre, A., Vance, M. A. P., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., Betancur, C., Bourgeron, T., Gillberg, C., Leboyer, M., Buxbaum, J. D., Davis, K. L., Hollander, E., Silverman, J. M., Hallmayer, J., Lotspeich, L., Sutcliffe, J. S., Haines, J. L., Folstein, S. E., Piven, J., Wassink, T. H., Meyer, K. J., Sheffield, V., Geschwind, D. H., Bucan, M., Brown, W. T., Cantor, R. M., Constantino, J. N., Gilliam, T. C., Herbert, M., LaJonchere, C., Ledbetter, D. H., Martin, C. L., Miller, J., Nelson, S., Sprouse, C. A. S., Spence, S., State, M., Tanzi, R. E., Coon, H., Dawson, G., Devlin, B., Estes, A., Flodman, P., Klei, L., McMahon, W. M., Minshew, N., Munson, J., Korvatska, E., Rodier, P. M., Schellenberg, G. D., Smith, M., Spence, M. A., Stodgell, C., Tepper, P. G., Wijsman, E. M., Yu, C. E., Rogé, B., Mantoulan, C., Wittemeyer, K., Poustka, A., Felder, B., Klauck, S. M., Schuster, C., Poustka, F., Bölte, S., Matthews, S. F., Herbrecht, E., Schmötzer, G., Tsiantis, J., Papanikolaou, K., Maestrini, E., Bacchelli, E., Blasi, F., Carone, S., Toma, C., Engeland, H. V., Jonge, M., Kemner, C., Koop, F., Langemeijer, M., Hijmans, C., Staal, W. G., Baird, G., Bolton, P. F., Rutter, M. L., Weisblatt, E., Green, J., Aldred, C., Wilkinson, J. A., Pickles, A., Couteur, A. L., Berney, T., McConachie, H., Bailey, A. J., Francis, K., Honeyman, G., Hutchinson, A., Parr, J. R., Wallace, S., Monaco, A. P., Barnby, G., Kobayashi, K., Lamb, J. A., Sousa, I., Sykes, N., Cook, E. H., Guter, S. J., Leventhal, B. L., Salt, J., Lord, C., Corsello, C., Hus, V., Weeks, D. E., Volkmar, F., Tauber, M., Fombonne, E. & Shih, A. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* **40**, 90–95 (2007).

Takahashi, M., Shirakawa, O., Toyooka, K., Kitamura, N., Hashimoto, T., Maeda, K., Koizumi, S., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Someya, T. & Nawa, H. Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol. Psychiatry* **5**, 293–300 (2000).

Teare, M. D. & Barrett, J. H. Genetic linkage studies. *Lancet* **366**, 1036–1044 (2005).

Theisen, A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* **1(1)** (2008).

Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C. & Bourgeron, T. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Gen.* **26(8)**, 363–372 (2010).

Treffert, D. A. Epidemiology of infantile autism. *Arch. General Psychiatry* **22**, 431–438 (1970).

Tuchman, R. & Rapin, I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurology* **1**, 352–358 (2002).

Ullmann, R., Turner, G., Kirchhoff, M., Chen, W., Tonge, B., Rosenberg, C., Field, M., Vianna-Morgante, A. M., Christie, L., Krepischi-Santos, A. C., Banna, L., Brereton, A. V., Hill, A., Bisgaard, A. M., Muller, I., Hultschig, C., Erdogan, F., Wiczorek, G. & Ropers, H. H. Array CGH Identifies Reciprocal 16p13.1 Duplications and Deletions That Predispose to Autism and/or Mental Retardation. *Hum. Mutation* **28(7)**, 674–682 (2007).

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* **44(5)**, 619–626 (2008).

Vorstman, J. A. S., Staal, W. G., Daalen, E., Engeland, H., Hochstenbach, P. F. R. & Franke, L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol. Psychiatry* **11**, 18–28 (2006).

Yamamoto, Y., Mizuno, R., Nishimura, T., Ogawa, Y., Yoshikawa, H., Fujimura, H., Adachi, E., Kishimoto, T., Yanagihara, T. & Sakoda, S. Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein: a novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J. Biol. Chem.* **269**, 31725–31730 (1994).

Yamao, T., Matozaki, T., Amano, K., Matsuda, Y., Takahashi, N., Ochi, F., Fujioka, Y. & Kasuga, M. Mouse and human SHPS-1: molecular cloning of cDNAs and chromosomal localization of genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 61–67 (1997).

Yan, J., Oliveira, G., Coutinho, A., Yang, C., Feng, J., Katz, C., Sram, J., Bockholt, A., Jones, I. R., Craddock, N., Cook, E. H., Vicente, A. & Sommer, S. S. Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol. Psychiatry* **10**, 329–332 (2005).

Yan, X., Li, F., Liang, Y., Shen, Y., Zhao, X., Huang, Q. & Zhu, X. Human Nudel and NudE as regulators of cytoplasmic dynein in poleward protein transport along the mitotic spindle. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1239-1250 (2003).

Yirmiya, N., Rosenberg, C., Levi, S., Salomon, S., Shulman, C., Nemanov, L., Dina, C. & Ebstein, R. P. Association between the arginine vasopressin 1a receptor (AVPR1a) gene and autism in a family-based study: mediation by socialization skills. *Mol. Psychiatry* **11**, 488–494 (2006).

Wang, J. L., Yang, X., Xia, K., Hu, Z. M., Weng, L., Jin, X., Jiang, H., Zhang, P., Shen, L., Guo, J. F., Li, N., Li, Y. R., Lei, L. F., Zhou, J., Du, J., Zhou, Y. F., Pan, Q., Wang, J., Wang, J., Li, R. Q. & Tang, B. S. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain* **133**, 3510-3518 (2010)

Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M. A., Green, T., Platt, O. S., Ruderfer, D. M., Walsh, C. A., Altshuler, D., Chakravarti, A., Tanzi, R. E., Stefansson, K., Santangelo, S. L., Gusella, J. F., Sklar, P., Wu, B. L., Daly, M. J. & Autism Consortium. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* **358**, 667–675 (2008).

Whitney, E. R., Kemper, T. L., Bauman, M. L., Rosene, D. L. & Blatt, G. J. Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: a stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum* **7(3)**, 406-416 (2008).

World Health Organization (WHO). *International classification of mental and behavioral disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Tenth edition. Geneva. World Health Organization. 2010.

Wing, L. & Potter, D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **8 (3)**, 151–161 (2002).

Wiznitzer, M. Autism and Tuberous Sclerosis. *Child Neurol* **19**, 675—679 (2004).

Zoghbi, H. Y. Postnatal Neurodevelopmental Disorders: Meeting at the Synapse? *Science* **302**, 826-830 (2003).

- Referencias Internáuticas

American Psychiatric Association (APA). 2012. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5. <http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx> (Acedido em 2012)

Autism Genome Project (AGP). 2012. Investigating the genetic basis of autism. <http://www.autismgenome.org/> (acedido a 16-10-2011)

Emory Genetics Laboratory (EGL). 2012. Genetics of Autism Spectrum Disorders. <http://genetics.emory.edu/egl/featuredtests/index.php/1643> (acedido a 23-2-2012)

Genecards. 2012. Human Genes Database. <http://www.genecards.org/> (acedido a 2-3-2012)

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2007. Microarrays: chipping away at the mysteries of science and medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html> (acedido em 03-11-2011)

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2012. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (acedido a 2-11-2012)

National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2011. Genome-Wide Association Studies. <http://www.genome.gov/20019523> (acedido em 12-11-2011)

Sigma-Aldrich. 2012. Light Cycler® probes. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/fluorescent-probes/lightcycler-probes1.html> (acedido a 2-7-2012)

Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI). 2012. Copy Number Variant: An integrated catalogue of copy number variants. <https://gene.sfari.org/autdb/CNVHome.do> (acedido a 3-8-2012)

University of California Santa Cruz (UCSC). 2012. Genome Browser. <http://genome.ucsc.edu/> (acedido a 15-8-2012)

Anexos

Anexo 1. Avaliação Clínica das crianças com autismo.

Tabela Suplementar 1. Nível de severidade das perturbações do espectro do autismo (APA, 2012 – online [<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>]).

Nível de severidade da PEA	Interação social e comunicação	Interesses restritos e comportamentos repetitivos
Nível 3 (Necessitam de um acompanhamento muito substancial)	<ul style="list-style-type: none"> Défice severo na capacidade de interação social verbal e não verbal, com incapacidades severas a nível funcional. Iniciativa muito limitada de interação social. Fraca resposta a exigências sociais. 	<ul style="list-style-type: none"> Preocupações, comportamentos e/ou rituais fixos, que interferem muito a nível funcional. Revelam stress quando os rituais ou rotinas são interrompidos. Grande dificuldade para redirecionar os interesses repetitivos.
Nível 2 (Necessitam de um acompanhamento substancial)	<ul style="list-style-type: none"> Défice severo na capacidade de interação social verbal e não verbal, com incapacidades severas a nível funcional, mesmo quando há ajuda de outrem. Iniciativa limitada de interação social. Resposta reduzida ou anormal a exigências sociais. 	<ul style="list-style-type: none"> Comportamentos restritos e repetitivos e/ou preocupações ou interesses fixos, que aparecem com frequência, interferindo a nível funcional. Revelam stress ou frustração quando os comportamentos restritos e repetitivos são interrompidos. Dificuldade para redirecionar os interesses repetitivos
Nível 1 (Necessitam de acompanhamento)	<ul style="list-style-type: none"> Défice na capacidade de interação social, quando não há ajuda de outrem, com incapacidades a nível funcional. Dificuldade em iniciar interações sociais. Respostas a exigências sociais são mal sucedidas, o que causa uma diminuição do interesse a nível social. 	<ul style="list-style-type: none"> Comportamentos restritos e repetitivos interferem significativamente a nível funcional. Resistência às tentativas de interrupção dos comportamentos restritos e repetitivos.

Tabela Suplementar 2. Subescalas constantes na Escala II de desenvolvimento mental de Ruth Griffiths (Griffiths, 1970; Griffiths,1984).

Escala II de desenvolvimento mental de Ruth Griffiths	
Locomotor Scale (AQ)	Observação de fraquezas físicas ou défices a nível do movimento.
Personal-Social Scale (BQ)	Avaliação do desenvolvimento a nível pessoal e social.
Hearing and Speech Scale (CQ)	Avaliação do desenvolvimento da linguagem.
Eye and Hand Co-ordination Scale (DQ)	Avaliação das capacidades manuais e visuais.
Performance Scale (EQ)	Medição da capacidade de manipulação e avaliação da rapidez e precisão.
Practical Reasoning Scale (FQ)	Avaliação da compreensão aritmética e da capacidade de resolução de problemas práticos.

Tabela Suplementar 3. Subtestes constantes na Escala de Inteligência de Wechsler para crianças (Cruz, 2005).

Escala de Inteligência de Wechsler para crianças	
Subtestes Verbais	Informação, semelhanças, aritmética, vocabulário, compreensão e dígitos.
Subtestes de Execução	Completar figuras, descobrir códigos, arranjar de figuras e cubos, armar objetos, procurar símbolos e resolver labirintos.

Anexo 2. Isolamento e contagem de células.

1. Transferir por decantação o sobrenadante dos tubos CPT para 1 tubo Falcon.
2. Centrifugar 10 min a 1300 rpm, 4°C, A (9) e T (8).
3. Alíquotar o plasma em eppendorfs de 1.5 ml (\pm 4 tubos) e guardar a -80°C.
4. Ressuspender o pellet em 1 ml de PBS 1x estéril 4°C (frigorífico C-14).
5. Fazer a contagem de células a partir da suspensão anterior:
 - 5.1 Juntar num eppendorf 1 μ l da suspensão anterior e 9 μ l de Trypan Blue (corante).
 - 5.2 Contar as células num dos quadrantes da câmara de Neubauer (câmara especial usada para contagem de células).

$$\text{N}^{\circ}\text{células} = \text{n}^{\circ}\text{células contadas} \times 10^5$$

$$\text{Volume} = 5 \times 10^9 / \text{n}^{\circ}\text{ células } (\mu\text{l})$$

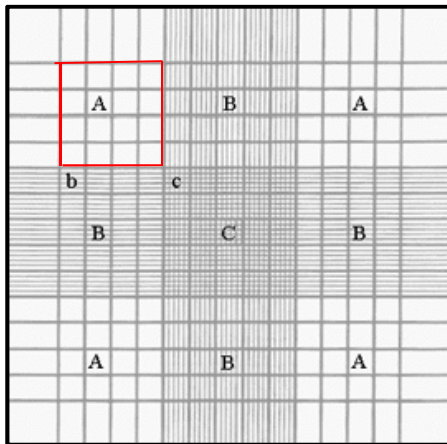


Figura Suplementar 1. Câmara de Neubauer.

6. Centrifugar os tubos Falcon (passo 4) 10 minutos a 1300 rpm, 4°C, A (9) travão 8).
7. Desprezar o sobrenadante por decantação e ressuspender o pellet em 2ml de FCS + 10% DMSO (Solução de 45 ml de FCS(-20°C) + 5 ml de DMSO e guardar a 4°C).
8. Alíquotar em 2 criotubos (\pm 1 ml em cada) guardar numa caixa de congelação a -80°C.

Anexo 3. Extração de DNA de sangue periférico (adaptado a partir de Lahiri & Nurnberger, 1991).

1. Homogeneizar bem o sangue colhido em EDTA e decantar para um tubo falcon de polipropileno de 15 ml. Anotar o volume de sangue.
2. Adicionar igual volume de TKM x-100 e agitar por inversão.
3. Adicionar IGEPAL (25 μ l por ml de sangue) para lise das células.
4. Agitar por inversão até solubilização total.
5. Centrifugar 10 min a 3153 rpm e à temperatura ambiente, com aceleração 9 e travão 7 (o pellet dos núcleos deve ficar aderente ao fundo do tubo).
6. Desprezar o sobrenadante por decantação para o frasco de resíduos.
7. Adicionar TKM1 ao pellet (1 ml por ml de sangue) para lavagem das células e agitar por inversão.
8. Centrifugar a 1600 rpm durante 10 min, à temperatura ambiente, com aceleração 9 e travão 7 e desprezar o sobrenadante.
9. Repetir o passo 7.
10. Ressuspender o pellet com TKM2 (160 μ l por ml de sangue) e homogeneizar.
11. Adicionar SDS 10% (10 μ l por ml de sangue) e homogeneizar.
12. Incubar a 55°C por 10 min.
13. Transferir com pipeta de pasteur todo o conteúdo do falcon para um eppendorf de 2 ml.
14. Adicionar NaCl 5M saturado (60 μ l por ml de sangue) para precipitar as proteínas e agitar por inversão.
15. Centrifugar durante 20 min a 13200 rpm e à temperatura ambiente.
16. Depois de formado um pellet de proteínas, transferir o sobrenadante (contém o DNA) com um pipeta de pasteur para um tubo falcon.
17. Adicionar etanol absoluto à temperatura ambiente (2,3 ml por 5 ml de sangue) e misturar lentamente por inversão até serem visíveis as fibrilhas de DNA.
18. Retirar o DNA precipitado com uma ansa e lavar com etanol a 70% a 4°C. Deixar o pellet de DNA secar ao ar.
19. Ressuspender o DNA em TE (cerca de 150 μ l) e partir a ansa com o DNA seco e colocar num eppendorf de 1,5 ml.
20. Guardar o DNA dissolvido a 4°C e fazer posteriormente a sua quantificação.

Anexo 4. Extração de RNA.

1. Transferir para eppendorf as células suspensas (no caso da suspensão de células ser guardada em RNA latter depois de ter sido feita a sua contagem) ou centrifugar eppendorf com o volume da suspensão de células (cálculo feito depois de ser realizada a contagem de células) a 10 000 rpm / 1min / 4°C (spin-down).
 - 1.1 No caso de ser usado RNA latter, será necessário primeiro centrifugar os tubos a 4000 rpm na centrífuga, durante 10 minutos e retirar cerca de 2 ml de sobrenadante.
2. Remover o sobrenadante para o frasco de resíduos de RNA.
3. Ressuspender o pellet em 350 µL de tampão RLT + β Mercaptoetanol.
4. Com a ajuda de uma seringa de 1ml e agulha de 0,6 mm, aspire o lisado 10x para lisar bem as células.
5. Adicionar ao lisado 350 µl de Etanol 70%. Homogeneizar por pipetagem.
6. Aplicar 700 µl da amostra a uma mini coluna RNeasy colocada num tubo colector de 2ml.
7. Centrifugar a 10 000 rpm / 1 min / 4°C.
8. Desprezar o eluído.
9. Adicionar 350 µl de tampão RW1 à coluna.
10. Centrifugar a 10 000 rpm / 1 min / 4°C.
11. Desprezar o eluído.
12. Adicionar 80 µl da mix DNase* directamente na membrana de sílica-gel da coluna RNeasy e repousar por 15 minutos na bancada.
13. Adicionar 350 µ de tampão RW1 à coluna RNeasy.
14. Centrifugar 10 000 rpm / 1 min / 4°C.
15. Transferir a coluna para um novo tubo colector de 2ml.
16. Adicionar 500 µl de tampão RPE .
17. Centrifugar 10 000 rpm / 1 min / 4°C.
18. Desprezar o eluído.
19. Adicionar 500 µl de tampão RPE.
20. Centrifugar a 10 000rpm / 2min / 4°C.
21. Transferir a coluna para um novo tubo colector de 2ml e centrifugar 10 000rpm / 1min.
22. Transferir a coluna para um novo eppendorf de 1,5ml e pipetar 50 µl de RNase free water directamente na membrana.
23. Centrifugar 10 000rpm / 1min / 4°C.
24. Desprezar a coluna e transferir 25 µl para um novo eppendorf de 1,5ml. Identificar com o código e data os 2 eppendorfs, com cerca de 25 µl de RNA cada.
25. Congelar a -80°C, para posterior extração de RNA.

Anexo 5. Controlo de qualidade das amostras de DNA.

Tabela Suplementar 4. Quantificação das soluções stock de DNA que foram usadas no trabalho.

Amostras	DNA ($\mu\text{g}/\text{ul}$)	(260/280)	Amostras	DNA ($\mu\text{g}/\text{ul}$)	(260/280)
Indivíduo 1	269,39	1,91	Indivíduo 5	215,1	1,93
Indivíduo 1_1	211,07	1,92	Indivíduo 5_1	154,2	1,88
Indivíduo 1_2	166,64	1,92	Indivíduo 5_2	203,2	1,89
Indivíduo 2	176,40	1,86	Indivíduo 6	226,95	1,93
Indivíduo 2_1	99,60	1,86	Indivíduo 6_1	371,22	1,88
Indivíduo 2_2	298,70	1,87	Indivíduo 6_2	456,87	1,88
Indivíduo 3	366,57	1,89	Indivíduo 7	177,5	1,9
Indivíduo 3_1	246,05	1,92	Indivíduo 7_1	210,2	1,84
Indivíduo 3_2	264,57	1,93	Indivíduo 7_2	224,1	1,85
Indivíduo 4	217,3	1,90	Indivíduo 8	610	1,84
Indivíduo 4_1	306,8	1,90	Indivíduo 8_1	364,8	1,82
Indivíduo 4_2	165,2	1,85	Indivíduo 8_2	341,7	1,84

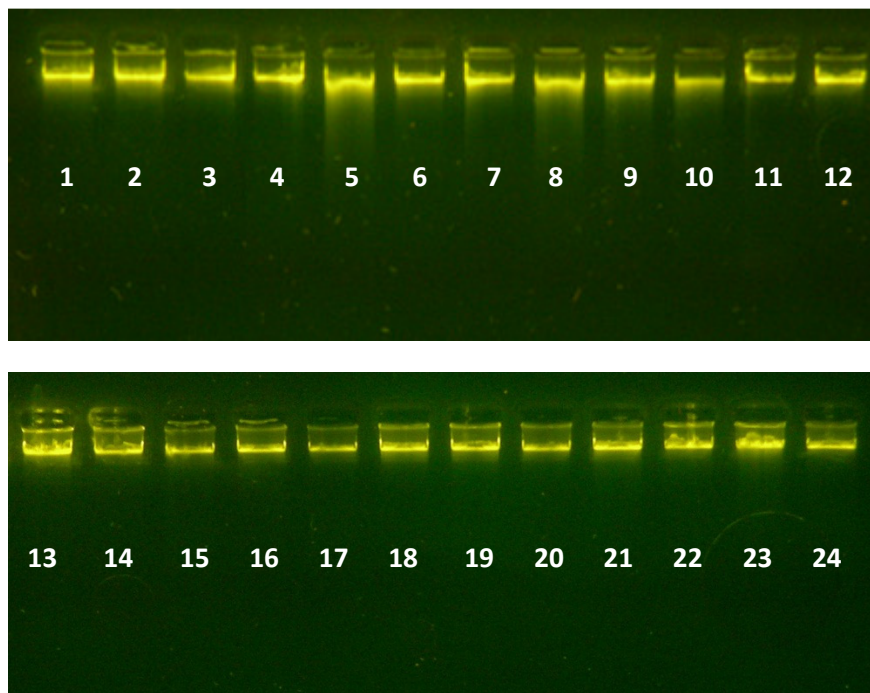


Figura Suplementar 2. Gel de agarose das amostras de DNA que foram usadas no trabalho laboratorial (1. Indivíduo 1; 2. Indivíduo 1_1; 3. Indivíduo 1_2; 4. Indivíduo 8; 5. Indivíduo 8_1; 6. Indivíduo 8_2; 7. Indivíduo 3; 8. Indivíduo 3_1; 9. Indivíduo 3_2; 10. Indivíduo 4; 11. Indivíduo 4_1; 12. Indivíduo 4_2; 13. Indivíduo 5; 14. Indivíduo 5_1; 15. Indivíduo 5_2; 16. Indivíduo 6; 17. Indivíduo 6_1; 18. Indivíduo 6_2; 19. Indivíduo 7; 20. Indivíduo 7_1; 21. Indivíduo 7_2; 22. Indivíduo 2; 23. Indivíduo 2_1; 24. Indivíduo 2_2).

Anexo 6. Rastreio populacional da duplicação presente na banda 9q21.13 em casos e controlos.

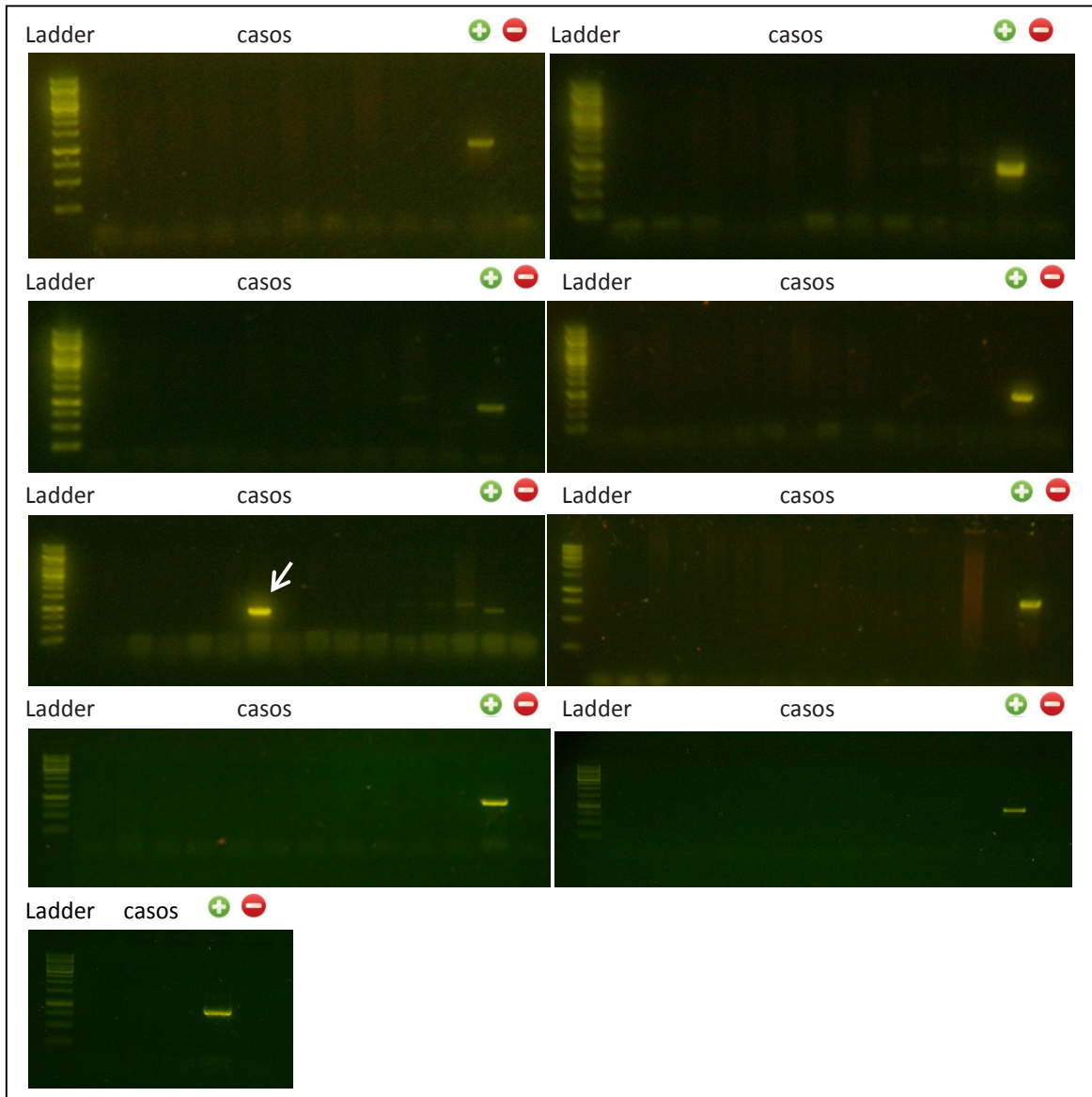


Figura Suplementar 3. Rastreio populacional da duplicação na banda 9q21.13 em 104 casos de autismo (as bandas correspondem a controlos positivos de autismo, excepto onde está indicado com a seta, em que se observa a presença desta duplicação num dos casos, correspondente ao individuo 2; + - controlo positivo, - controlo negativo).

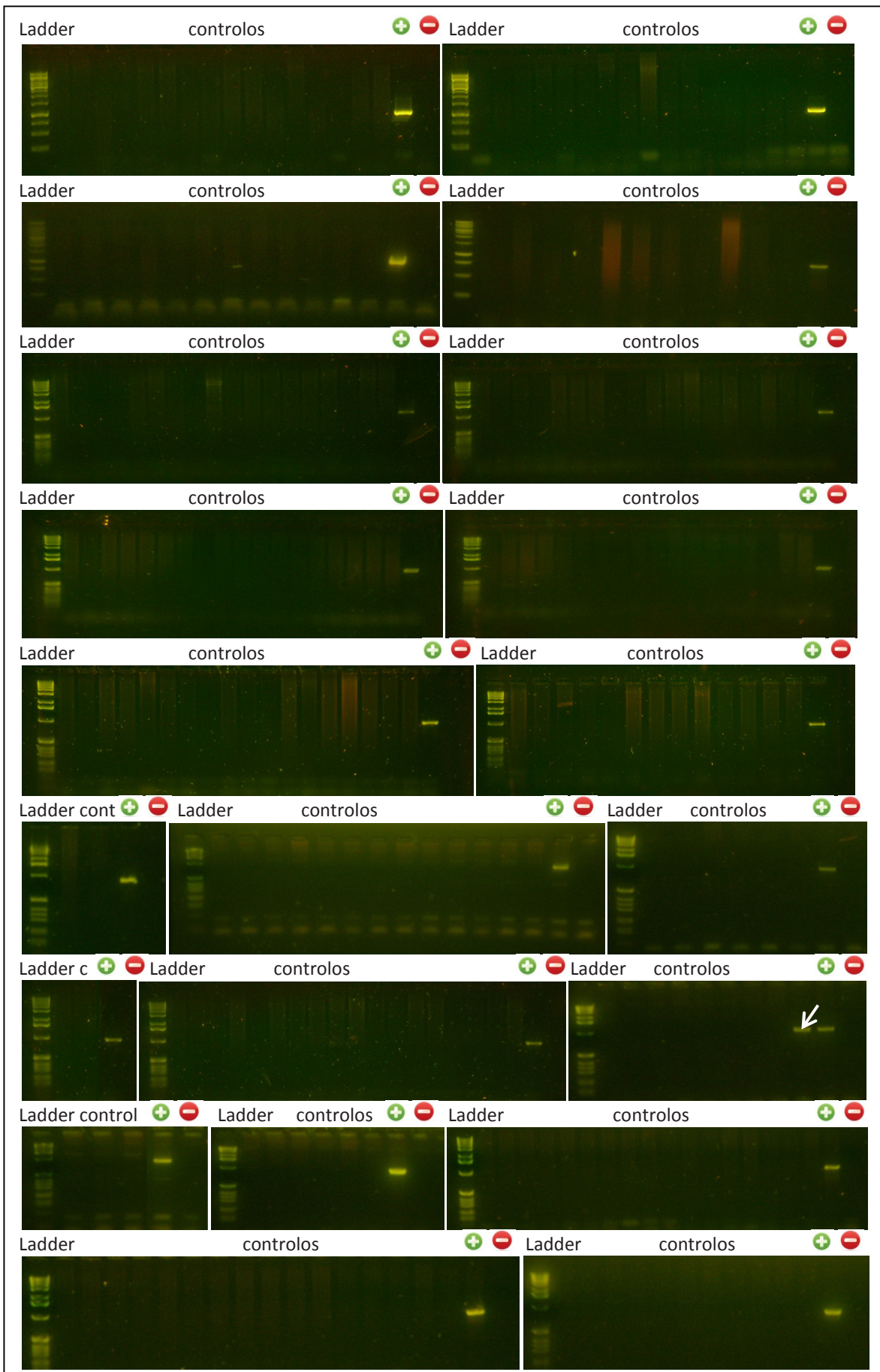


Figura Suplementar 4. Rastreamento populacional da duplicação na banda 9q21.13 em 265 controles (as bandas correspondem a controles positivos de autismo, excepto onde está indicado com a seta, em que se observa a presença desta duplicação num dos casos, o indivíduo 2; + - controlo positivo, - - controlo negativo).

Anexo 7. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 9q21.13.

Tabela suplementar 5. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da duplicação presente na zona 9q21.13 no Indivíduo 2 (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do Indivíduo 2 (duplicação na banda 9q21.13)

```
CTTTGTTTGGTTGCTTACTGTACTTGGTGTATTTCTGAAACACTGAATATTTAAATTCAAACTAAGATACATGCAAA  
ACATCCTTTTCTTTAGAAAGCTTTAGCAAATCAAGGCAACTGACTCAAAGAATTTTTAGAAATAACAACCTTGG  
CTACACCTTTTAAAGCAATATACCCAATTAATCATAACGTGAATACTTCATCCTCTCCTAGGAATGTAACCTTACC  
TGGCCATTTTGGTATTCTATATATTTTGGCGAAATGTTTGCAAATGTTGACAGTTATTAGAAACGGCATGTGAT  
TGACAACCTATAGCACTTCCCTACAGCAGTTCTAAGAGCCACAGCAAATGGATCTTCCCTTATATAAAGACCTGTGC  
ACTAAATTTCTCTTACATTTAACAGTAGAAATCAGTATACTATTATAAGATGGTGAACCTTTGGTAATTGTCATAA  
CTTTTCCATCGCCTTCACTTCCAAGAGGCCAGAGCTAAATCTTGCACTCAAAGGCCAGGACTTTTTCTGAGTTT  
TGTCTTGTGTGTTGTTTTTCCAAAGCACCTACATATTTCTTTCTTCATTTAGCTCTGATAAAGTAAGTAAGTTCAG  
CACTTTTCGGAAGGTATATCAGACAGGGCCCTAGAAGGAAATGGCTAGTATAACAAGCTGGACATTTGACGATTGT  
TTTAATTATGGGAATACTGAGGTGTACTTCCCTTAGAGGTGTAGGCAAGTTAAGAGAACCCACATGAGATATTGCA  
GTATCTACGGAGCAGCAGCAGCAGGAATCCCAAGTCCAAAAGGGCAAGGAGAGGAAATAGTTGAGAGCTAGAGCC  
TCAGACAAGGTGACACCCTGATGGAAGT
```

Tabela suplementar 6. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da duplicação presente na zona 9q21.13 no Indivíduo 2_1 (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do Indivíduo 2_1 (duplicação na banda 9q21.13)

```
CTTTGTTTGGTTGCTTACTGTACTTGGTGTATTTCTGAAACACTGAATATTTAAATTCAAACTAAGATACATGCAAA  
ACATCCTTTTCTTTAGAAAGCTTTAGCAAATCAAGGCAACTGACTCAAAGAATTTTTAGAAATAACAACCTTGG  
CTACACCTTTTAAAGCAATATACCCAATTAATCATAACGTGAATACTTCATCCTCTCCTAGGAATGTAACCTTACC  
TGGCCATTTTGGTATTCTATATATTTTGGCGAAATGTTTGCAAATGTTGACAGTTATTAGAAACGGCATGTGAT  
TGACAACCTATAGCACTTCCCTACAGCAGTTCTAAGAGCCACAGCAAATGGATCTTCCCTTATATAAAGACCTGTGC  
ACTAAATTTCTCTTACATTTAACAGTAGAAATCAGTATACTATTATAAGATGGTGAACCTTTGGTAATTGTCATAA  
CTTTTCCATCGCCTTCACTTCCAAGAGGCCAGAGCTAAATCTTGCACTCAAAGGCCAGGACTTTTTCTGAGTTT  
TGTCTTGTGTGTTGTTTTTCCAAAGCACCTACATATTTCTTTCTTCATTTAGCTCTGATAAAGTAAGTAAGTTCAG  
CACTTTTCGGAAGGTATATCAGACAGGGCCCTAGAAGGAAATGGCTAGTATAACAAGCTGGACATTTGACGATTGT  
TTTAATTATGGGAATACTGAGGTGTACTTCCCTTAGAGGTGTAGGCAAGTTAAGAGAACCCACATGAGATATTGCA  
GTATCTACGGAGCAGCAGCAGCAGGAATCCCAAGTCCAAAAGGGCAAGGAGAGGAAATAGTTGAGAGCTAGAGCC  
GAGCCCTCAGACAAGGTGACACC
```

Tabela suplementar 7. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da duplicação presente na zona 9q21.13 no controlo (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do controlo (duplicação na banda 9q21.13)

```
ACTTTGTTTGGTTGCTTACTGTACTTGGTGTATTTCTGAAACACTGAATATTTAAATTCAAACTAAGATACATGCAA  
AACATCCTTTTCTTTAGAAAGCTTTAGCAAATCAAGGCAACTGACTCAAAGAATTTTTAGAAATAACAACCTTGG  
GCTACACCTTTTAAAGCAATATACCCAATTAATCATAACGTGAATACTTCATCCTCTCCTAGGAATGTAACCTTAC  
CTGGCCATTTTGGTATTCTATATATTTTGGCGAAATGTTTGCAAATGTTGACAGTTATTAGAAACGGCATGTGA  
TTGACAACCTATAGCACTTCCCTACAGCAGTTCTAAGAGCCACAGCAAATGGATCTTCCCTTATATAAAGACCTGTG  
CACTAAATTTCTCTTACATTTAACAGTAGAAATCAGTATACTATTATAAGATGGTGAACCTTTGGTAATTGTCATA  
ACTTTTCCATCGCCTTCACTTCCAAGAGGCCAGAGCTAAATCTTGCACTCAAAGGCCAGGACTTTTTCTGAGTT  
TTGTCTTGTGTGTTGTTTTTCCAAAGCACCTACATATTTCTTTCTTCATTTACTCTGATAAAGTAAGTAAGTTCAG  
CACTTTTCGGAAGGTATATCAGACAGGGCCCTAGAAGGAAATGGCTAGTATAACAAGCTGGACATTTGACGATTGT  
TTTAATTATGGGAATACTGAGGTGTACTTCCCTTAGAGGTGTAGGCAAGTTAAGAGAACCCACATGAGATATTGCA  
GTATCTACGGAGCAGCAGCAGCAGGAATCCCAAGTCCAAAAGGGCAAGGAGAGGATATAGTTGAGAGCTAGAGCC  
TCAGAACAGGTGACACCCTGATGGAA
```

Anexo 8. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 9q31.1.

Tabela Suplementar 8. Restantes *primers* usados para amplificação por *Nested PCR*, durante a sequenciação dos pontos de quebra da deleção 9q31.1.

CNV	Primers	Sequências dos primers
9q31.1	CHR9_F3	5'-CCAAACCTGGCAAACTTGT-3' (F)
	CHR9_F4	5'-TTCTCATGTGGTGGTTCCA-3' (F)
	CHR9_R4	5'-CAGGCACGCATCACTACACT-3' (R)
	CHR9_R5	5'-CCTTACCACCTGTCTTGGT-3' (R)

Tabela Suplementar 9. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da deleção presente na zona 9q31.1 no Indivíduo 3 (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, as que estão representadas num tom mais claro de azul observam-se nas sequências antes e depois do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do Indivíduo 3 (deleção na banda 9q31.1)

ATGAATTTGGCTTTTGATGAATTCAGTTAATGTTGCAAGACAGCTTCTTATAATCCTGTTTTTCATCCTTGIGAT
TTTTTTAGGGGGGCTGGGAAAGAGGAAGAATTTTCGTTTGAGCTAAAATTTCCATGGTTTGACTCAGCCCAAGG
AGATTTTCAAAAATGAAACATTTTCACAAACGTTTCCATTTATTTTTGAGTTATTGTATTTGGAAAATGCTGTTT
ATTTTTACTCCAAGTATTATTAATGCATAAAAATGTTCCAAGTATGAATGGTTATTAAAACCTCAGTCATCACATG
CCACTTGTGTCAGGAATTTTCATCTGAGCAAGATTTAAAAGAATTATAATTGCCAAGGACTAGCTTCCTTCTTTTT
ATAACTATATTGAAGCATTTAGTGCAAAAATGCCTAGAATTTTTCATTATTTTCATAATATCATTGTAATGCCTA
CTTAGCACAGAGCTTTTCAGAGAAAATAAATAGATTACTTTTACTATTTTTGAATTTATGATGAACTCTAAAGTG
TACTATATTTTGAAAAAAATTTGAGAGCTTTATAATCTGCCCTTGAGATAATGTTACATTTTGAGTAGAGCCA
TGAAGCTTGTGTTTTCTTAATGATTACTGTTTAGCCATTAACAGATTATGTGATCTATTCAGATAA
TGCTAATTGTGAATACTAATAAGTCTTTTTGATTATTGTTATCTGGTTGTTAGATTAATCAGTATCAATAGATGA
TCAGTATATTACCCTTTTTTCTTACCAGTCAGTATGAATAAAAATTTAAACCCCCAGAGTAATTATGTATTCTTT
TTTTAGCACAGTAAGTCAAAAAGATTTGACTTGGATATCATTTAATTAATGAATGAAAATGATGCAAACCTTCC
TTAGCCCATAC

Anexo 9. Sequenciação dos pontos de quebra do CNV presente na zona 20p13.

Tabela Suplementar 10. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da duplicação presente na zona 20p13 no Indivíduo 8 (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, as que estão representadas num tom mais claro de azul observam-se nas sequências antes e depois do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do Indivíduo 8 (duplicação na banda 20p13)

```
ATGCCTACAAGATGCTGATGGCCAAGGTGTGTGGGGTGGGGGCAGTGAATCTGTTGGGAGGGCTTGCTCAGCTTT
GGAATCTGGCGACCAACTTCGGCAACTGCCAGCTTCGCCATTTGTGTCCAGCTGCCCCAGAAATCCTGGGTGTG
AGGGCCACCTGACCATTCTGATCCATCTAGGCAGCTCCAAGCTGTTCATTCACCCCATGGAAGCACCAAGAAAACA
ACCAGAGACTGGTTTAGAATAATATAGGAGCTCTGGAAAAACAGTCAAAGGTTTACAGCACCCAGGTGAATACCT
AATCAAGAAAAAGCCACCTTCAAACAGCAGAAAAAGTTTTGTGGCATTTTTACTCCCTTTTGCCCAACCCCTCC
CTGGCACAGCAGCCATTTCCCTCCCTTGAGCCAGAGGGAGCAAGCCTACCTTACTGGCAACACTCTAACTGGTC
TGAGGCCTGCCTGGAGGACAGCTCTCTGTTTTGTCTAACTAAAATCTCAGGTAGAGGGAAGCTGAGGGCACTGTT
GGTGAAGCTGCAGGGAGACTATAGACCCATAGATGACTGGGGCAAGAGATTATGAGTGGACACACACAATAGAC
CATCTGTGGCCCTAAGGAGAAGCTGGGTGCTGGGGTAAGATTCTTTGAAAAAGTAAGACATTCAAAAGCAGCTGT
ACATATGGAGGAATTGAGTAAGCCACATTTAGGAGCAGGCAAGATTTCATTCTCAGAAAAGACCTGAGAAGACCTG
AAGCTTCACCTTGGTGAAGGATTGTGTAAACACAGAGTCAGTTTGCAAAGCCTGGGAGAGGCAGCTGTTTTTTTC
AAATGTCCAGTTTTCAACAACACCACAACCAAAAACACAACAAGAAGTAGTAACACATGGCTCAT
```

Tabela Suplementar 11. Resultados da análise de sequenciação dos pontos de quebra da duplicação presente na zona 20p13 no Indivíduo 8_1 (as letras representadas com uma cor azul correspondem a parte da sequência que se localiza antes do ponto de quebra, as que estão representadas num tom mais claro de azul observam-se nas sequências antes e depois do ponto de quebra, estando este representado com a cor vermelha e a sequência com uma cor verde é a que se localiza a seguir ao ponto de quebra).

Sequenciação dos pontos de quebra do Indivíduo 8_1 (duplicação na banda 20p13)

```
GGCAAGCAACTATATGCCTACAGATGCTGATGGCCAAGGTGTGTGGGGTGGGGGCAGTGAATCTGTTGGGAGGGC
TTGCTCAGCTTTGGAATCTGGCGACCAACTTCGGCAACTGCCAGCTTCGCCATTTGTGTCCAGCTGCCCCAGAA
ATCCTGGGTGTGAGGGCCACCTGACCATTCTGATCCATCTAGGCAGCTCCAAGCTGTTCATTCACCCCATGGAAGC
ACCAAGAAAAACAACCAGAGACTGGTTTAGAATAATATAGGAGCTCTGGAAAAACAGTCAAAGGTTTACAGCACCC
AGGTGAATACCTAATCAAGAAAAAGCCACCTTCAAACAGCAGAAAAAGTTTTGTGGCATTTTTACTCCCTTTTGC
CCAACCCCTCCCTGGCACAGCAGCCATTTCCCTCCCTTGAGCCAGAGGGAGCAAGCCTACCTTACTGGCAACA
CTCTAACTGGTCTGAGGCCTGCCTGGAGGACAGCTCTCTGTTTTGTCTAACTAAAATCTCAGGTAGAGGGAAGCT
GAGGGCACTGTTGGTGAAGCTGCAGGGAGACTATAGACCCATAGATGACTGGGGCATATGGACACACACAATAG
ACCATCTGTGGCCCTAAGGAGAAGCTGGGTGCTGGGGTAAGATTCTTTGAAAAAGTAAGACATTCAAAAGCAGCT
GTACATATGGAGGAATTGAGTAAGCCACATTTAGGAGCAGGCAAGATTTCATTCTCAGAAAAGACCTGAGAAGAC
CTGAAGCTTTACCCCTTGTGAAGGATTGTGTACACAGAGTCAGTTGCAAAGCCTGGGAGAGGCAGCTGTTTTTTCA
AATGTCCAGTTTTCAACACACCACACCAAAAACAACA
```