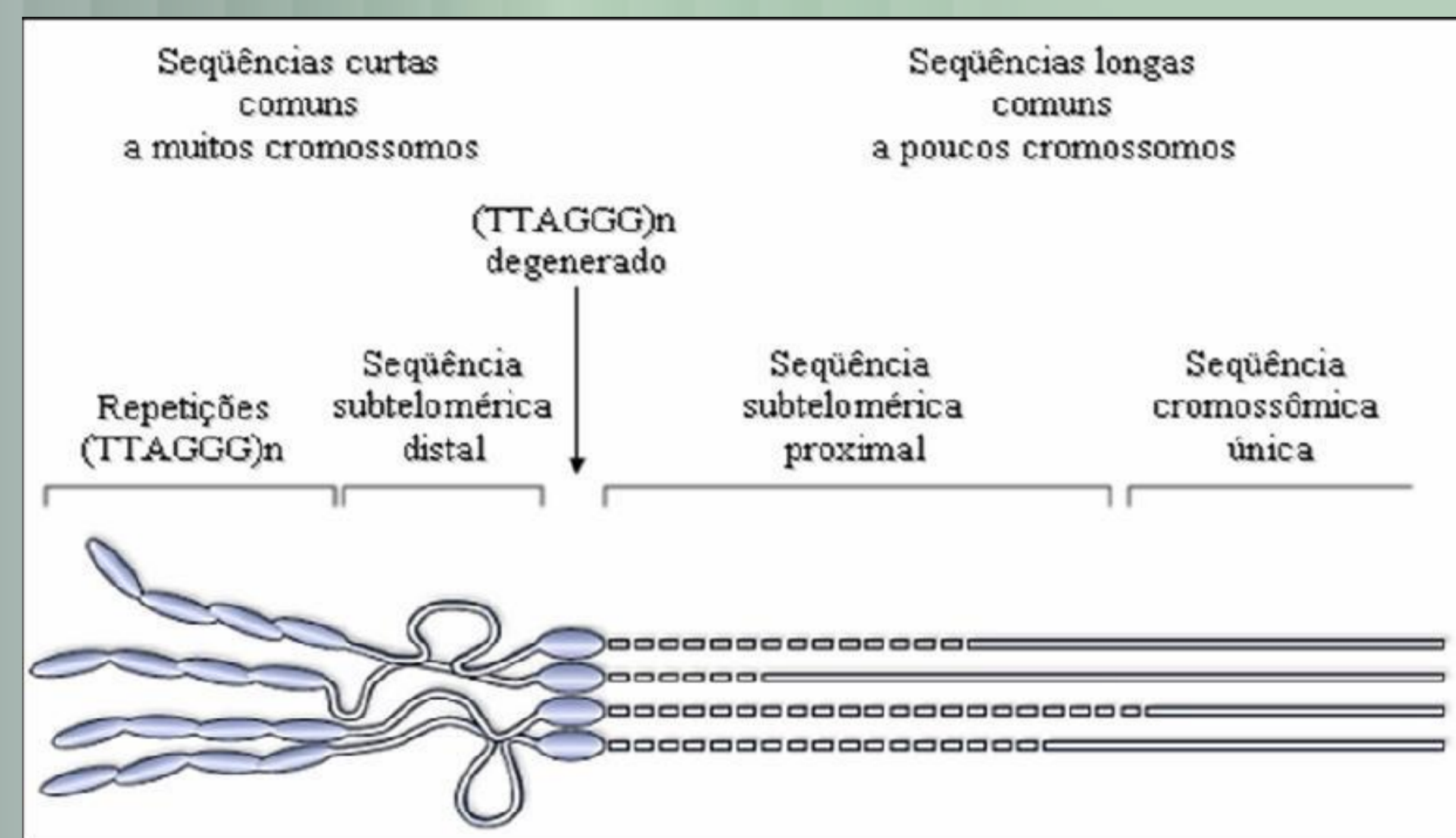


# TRIAGEM DE REARRANJOS SUBTELOMÉRICOS PELA TÉCNICA DE MLPA EM INDIVÍDUOS COM ATRASO DO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR OU DEFICIÊNCIA MENTAL DE CAUSA INDETERMINADA.

BELGINI, Daiane R. B.<sup>1</sup>; LINCOLN-DE-CARVALHO, Carolina R.<sup>2</sup>; VIEIRA, Táris A.P.<sup>2</sup>; MICHELATTO, Débora de P.<sup>1</sup>; MELLO, Maricilda P. de<sup>1</sup>; MARQUES-DE-FARIA, Antonia P.<sup>2</sup>  
 (1) Laboratório de Genética Humana - CBMEG – UNICAMP  
 (2) Departamento de Genética Médica – FCM – UNICAMP

## INTRODUÇÃO

Rearranjos subteloméricos (Figura 1) tem sido identificados em 5% a 7% dos casos de deficiência mental (DM) de origem indeterminada. Assim, o propósito deste trabalho foi pesquisar rearranjos subteloméricos em indivíduos com DM idiopática por meio da técnica de Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA), que vem se mostrando útil na identificação dessas alterações.

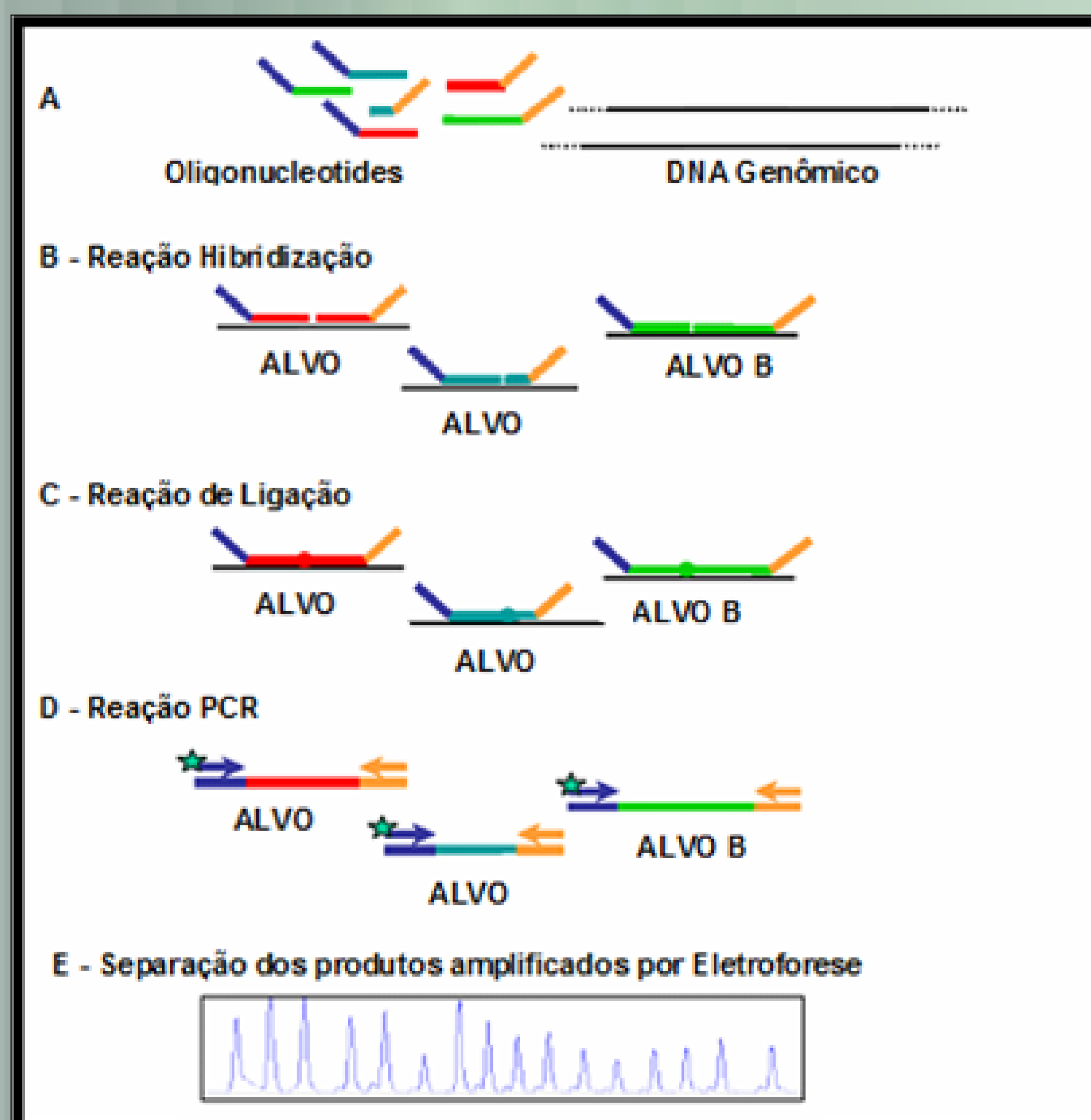


**Figura 1:** Organização das regiões teloméricas e subteloméricas dos cromossomos (adaptado de Flint *et al.*, 1997).

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram selecionados indivíduos de ambos os sexos com atraso neuropsicomotor ou DM sem determinação do diagnóstico etiológico, com base em critérios clínicos e após exame de cariótipo e pesquisa da mutação do X frágil com resultados normais.

A técnica de MLPA (Figura 2) foi aplicada em amostras de DNA extraídas e purificadas de leucócitos de sangue periférico, por meio dos kits SALSA P036-E1 e P070-A2 HUMAN TELOMERE específicos para a identificação de rearranjos subteloméricos.



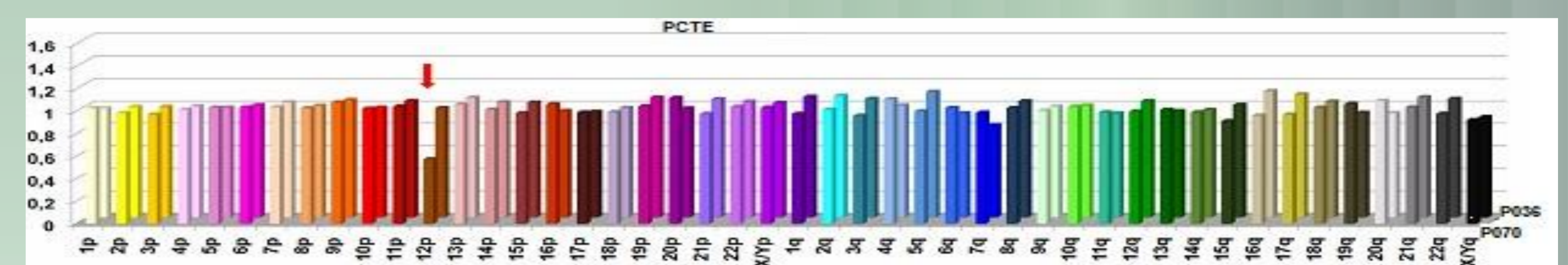
**Figura 2:**  
 A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem os kits P036-E1 e P070-A2 e DNA genômico;  
 B) Hibridizações adjacentes dos pares de sondas de MLPA nas seqüências alvo;  
 C) Reação de Ligação com união das sondas adjacentes pela enzima ligase;  
 D) Reação de PCR Multiplex amplificação com primers universais, na qual somente o primer direto é marcado com o corante FAM;  
 E) Separação por eletroforese capilar dos fragmentos amplificados.

Posteriormente, os produtos de PCR foram separados e identificados utilizando o equipamento ABI-PRISM® 310 DNA Analyser (Applied Biosystems - Applied Biosystems, Estados Unidos).

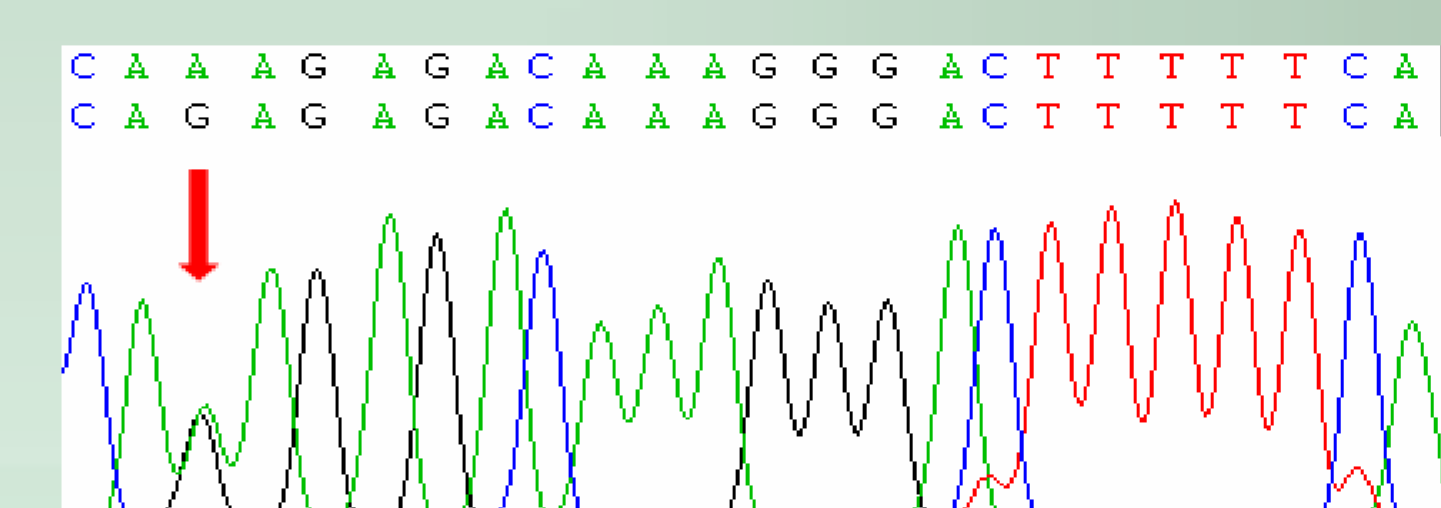
Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados e identificados pelos programas GeneScan® e Genotyper® (Applied, Biosystems) e planilhas do Microsoft Excel® específicas para cada kit.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

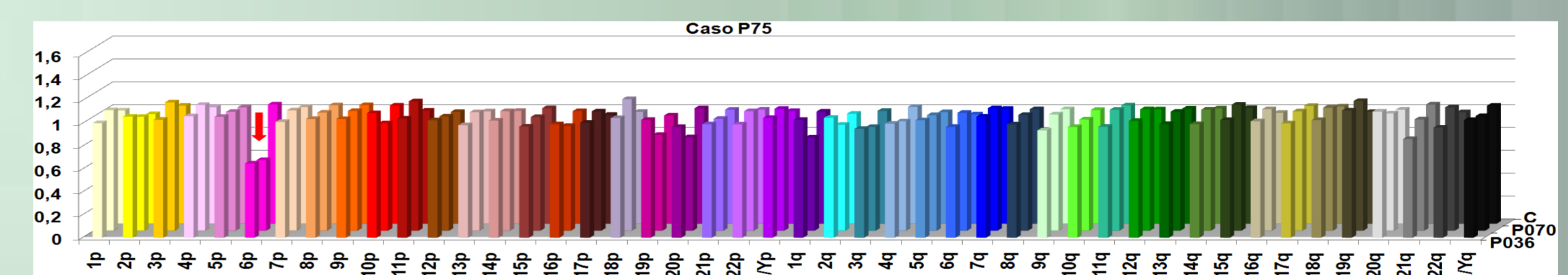
Foram analisados 50 pacientes. O resultado inicial das análises pelas sondas do kit SALSA MLPA P036-E1 mostrou alterações em 5 indivíduos (10%). Três deles, identificados como del(12p), não tiveram o resultado confirmado pelo kit SALSA P070-A2 (Figura 3). Porém, foram caracterizados como polimorfismos pela técnica de sequenciamento automático (figura 4). Os outros dois casos (4%) tiveram a alteração confirmada pelo kit SALSA MLPA P070-A2 (figuras 5 e 6), sendo a deleção 6p já validada pelo método de FISH (figura 7).



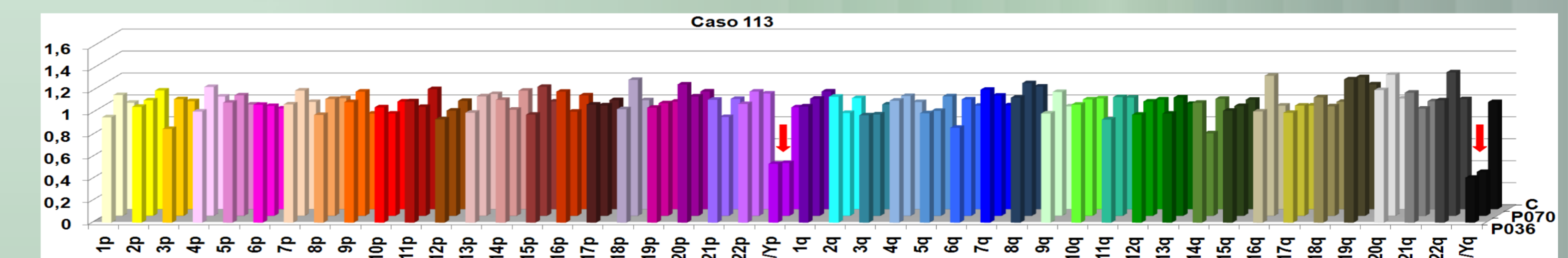
**Figura 3:** Gráfico do resultado de MLPA com o kit SALSA MLPA P036 obtido para os três indivíduos (P38, P68 e P142), em comparação com o resultado para o kit SALSA MLPA P070, segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.



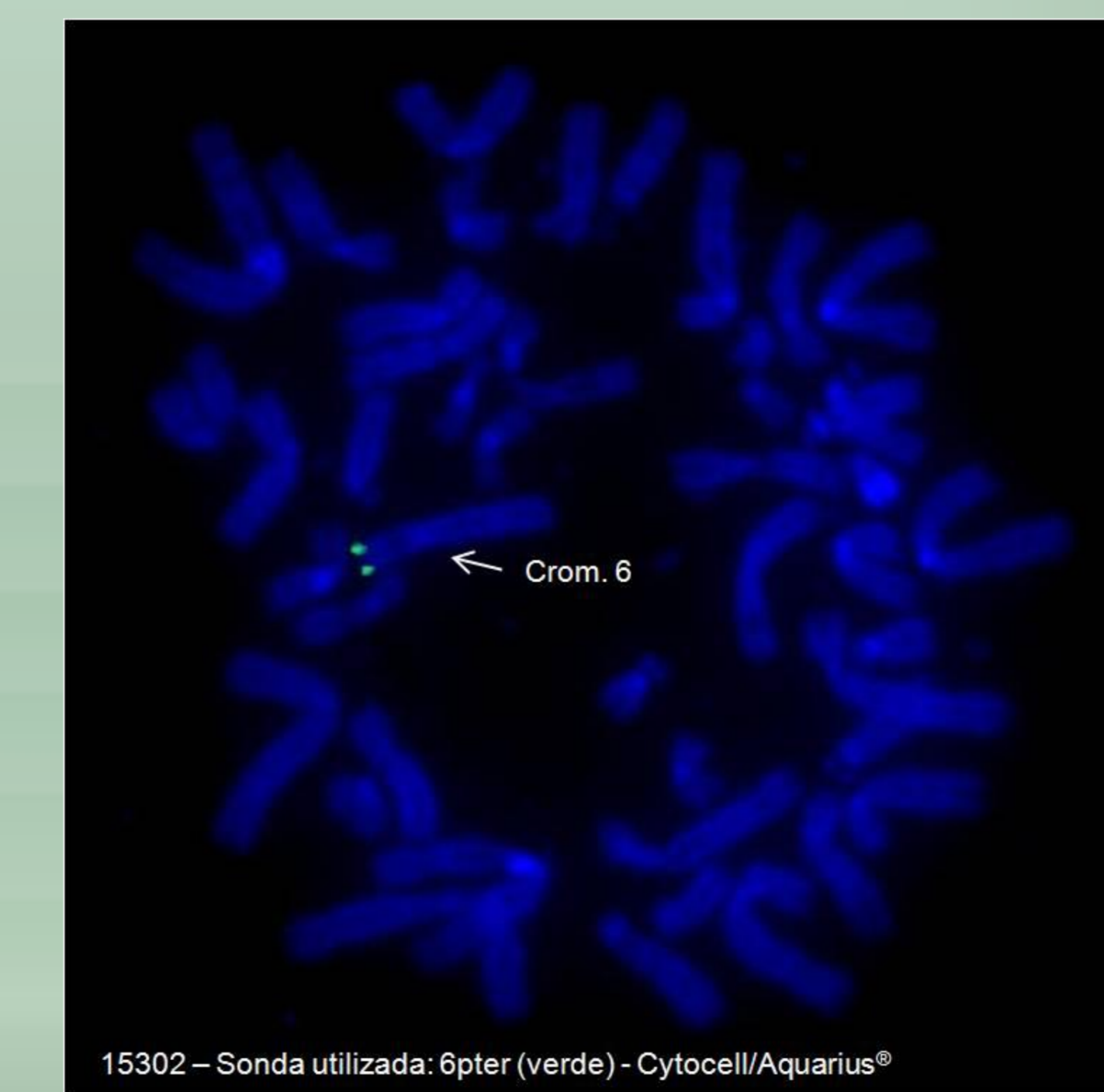
**Figura 4:** Sequenciamento do fragmento complementar à sonda 12p (kit SALSA MLPA P036) correspondente a uma porção da seqüência do exon 18 do gene SLC6A12. Em A a seqüência normal, sem alteração. Em B a seqüência encontrada nos três indivíduos, cujo resultado de MLPA com o kit SALSA MLPA P036 mostrara deleção. No detalhe, a troca nucleotídica A>G, observada nesses indivíduos (SNP rs 60220187).



**Figura 5:** Gráfico do resultado de MLPA com o kit SALSA MLPA P036 e o kit SALSA MLPA P070 para o indivíduo P75 (del6p), em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.



**Figura 6:** Gráfico do resultado de MLPA com o kit SALSA MLPA P036 e o kit SALSA MLPA P070 para o indivíduo P113, em comparação com controle sem alteração (C), segundo a planilha de análise do grupo NGRL-MANCHESTER.



**Figura 7:** FISH do caso P075 utilizando a sonda 6pter (verde) - Cytocell/Aquarius®, com sinal positivo para a região do braço curto do cromossomo 6 íntegro. A ausência de dois sinais indica a deleção 6pter no outro cromossomo.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos favorecem a indicação da técnica de MLPA como alternativa viável e de custo relativamente baixo para a triagem de alterações subteloméricas em indivíduos com atraso do desenvolvimento ou DM de causa indeterminada, precedendo e justificando a realização de métodos de custo mais alto, como o de *array-CGH*. O polimorfismo identificado também merece registro, como contribuição para a padronização e a interpretação dos resultados dessa técnica.