

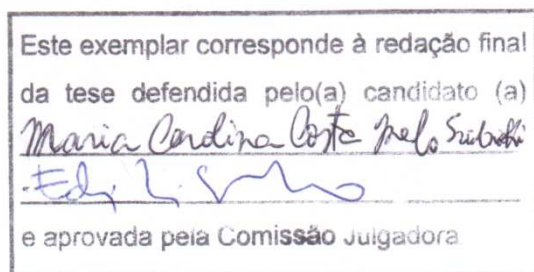
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**MARIA CAROLINA COSTA MELO SVIDNICKI**

**“ESTUDO DE GENES CANDIDATOS EM INDIVÍDUOS  
BRASILEIROS COM DISLEXIA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.



Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

**Campinas**

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sv35e

Svidnicki, Maria Carolina Costa Melo  
Estudo de genes candidatos em indivíduos brasileiros  
com dislexia / Maria Carolina Costa Melo Svidnicki. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Edi Lúcia Sartorato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dislexia. 2. Inabilidade na leitura. 3. *Multiplex  
ligation-dependent probe amplification*. 4. Estudos de  
associação genética. 5. Gene candidato. I. Sartorato,  
Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Study of dyslexia candidates genes in Brazilian individuals.

**Palavras-chave em inglês:** Dyslexia; Reading disability; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Genetic association studies; Candidate genes.

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Edi Lúcia Sartorato, Marcelo Lima Ribeiro, Cláudia Vianna Maurer Morelli.

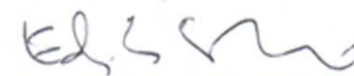
**Data da defesa:** 15/03/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 15 de Março de 2011

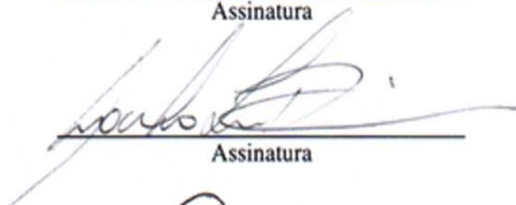
**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato



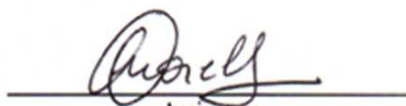
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro



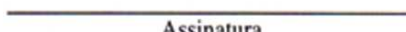
Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli



Assinatura

Profa. Dra. Camila Andréa de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo



Assinatura

*Aos meus pais Jonas e Iracema, meus  
irmãos Pedro e Paulo, e ao meu amor  
Heilordt, dedico este trabalho.*

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Edi Lúcia Sartorato, por me receber tão bem no laboratório, pela oportunidade em realizar este trabalho, pela dedicação e competência;

Ao Dr. Rodrigo Secolin por compartilhar seus conhecimentos, pela imprescindível ajuda com a análise estatística dos dados, e pela paciência em solucionar minhas dúvidas.

Aos profissionais do DISAPRE, em especial à fonoaudióloga Cíntia Alves Salgado, por sua prontidão e simpatia.

Aos profissionais da ATEAL;

Às famílias participantes desse estudo, pela colaboração;

Aos colegas Fer III, Carol Lincoln, Creyto e Dai pela ajuda com o elefante;

Aos colegas e ex-colegas do laboratório (Pri, Mari, Nathy, Ana Letícia, Paulo, Zélo, Creyto, Brutus, Fábio, Sueli, Vanessa, Reginaldo, Flávia flor, Mara, Camila, Fer II, Fer III, Renata, Débora, Cris, Helena, Dai, Xuxa, Batatinha, Jéssica, Carol Lincoln, , Paula, Diego, Elfo e Vanessinha) por me ajudarem a enfrentar esse desafio de forma descontraída e por todo o aprendizado que me proporcionaram;

À professora Maricilda pelos ensinamentos partilhados.

Aos professores e funcionários do CBMEG em especial às secretárias Sandra e Tânia.

Aos participantes da banca examinadora da qualificação e da pré-banca pelas sugestões e opiniões valiosas;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro durante esse período.

Aos meus pais Jonas e Iracema, pelo amor incondicional, pelo exemplo que tento seguir, por realizarem todos os meus sonhos, por sempre me apoiarem e orientarem nos obstáculos do dia-a-dia.

Quero agradecer em especial à minha mãe, pela presença nas etapas de qualificação e pré-banca e também nos ensaios de apresentação e nos momentos de nervosismo.

Aos meus irmãos Pedro e Paulo pelo carinho, amizade e apoio;

Ao meu noivo Heilordt por seu amor, incentivo, por compartilhar comigo todos os momentos bons e ruins no decorrer do mestrado, e por me incluir nos seus planos e na sua vida.

A toda a minha família, em especial às minhas tias, Eraldi e Laura, e aos meus avôs e avós queridos.

Enfim, a todos que fizeram parte da minha vida e acrescentaram algo de bom, que me fizeram crescer como pessoa e profissional.

**Muito Obrigada!**

---

<b>μL</b>	- Microlitro;
<b>ATEAL</b>	- Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e da Linguagem
<b>CBMEG</b>	- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
<b>CORF3</b>	- <i>Chromosome 2 open reading frame 3</i>
<b>DCDC2</b>	- <i>Doublecortin domain-containing protein 2</i>
<b>DISAPRE</b>	- Laboratório de Pesquisa em Dificuldades, Distúrbios de Aprendizagem e Transtornos da Atenção
<b>DYX1C1</b>	- <i>Dyslexia susceptibility 1 candidate gene 1</i>
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>MAF</b>	- Frequência Alélica Mínima
<b>Mb</b>	- Mega base
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	- Cloreto de Magnésio
<b>mL</b>	- Mililitro
<b>MLPA</b>	- Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação
<b>mM</b>	- Milimolar
<b>MRPL19</b>	- <i>Mitochondrial ribosomal protein L19</i>
<b>ng</b>	- Nanograma
<b>NRSN1</b>	- <i>Neurensin 1</i>
<b>OCT-1</b>	- <i>Organic Cation Transporter 1</i>
<b>Pb</b>	- Pares de base
<b>PCR</b>	- Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RNAi</b>	- Ácido Ribonucleico de interferência
<b>ROBO</b>	- Roundabout
<b>SNC</b>	- Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	- Polimorfismo de Único Nucleotídeo
<b>TBE</b>	- Trisborato EDTA
<b>TDT</b>	- Teste de Transmissão de de Desequilíbrio de Ligação
<b>TE</b>	- Tris EDTA
<b>THEM2</b>	- <i>Thioesterase Superfamily Member 2</i>
<b>TTRAP</b>	- <i>Traf and Tnf receptor associated protein</i>

---

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. O Aprendizado da Leitura.....	14
1.2. O Cérebro e a Linguagem.....	14
1.3. Dislexia do desenvolvimento.....	17
1.3.1. Definição atual.....	18
1.4.1. Aspectos neurobiológicos.....	19
1.3.2. Prevalência.....	21
1.3.3. Teorias sobre a dislexia do desenvolvimento.....	22
1.3.4. Classificação da Dislexia.....	24
1.3.5. Diagnóstico.....	24
1.3.6. Intervenção na dislexia.....	25
1.4. Contexto Multifatorial da Etiologia Dislexia.....	26
1.4.1. Aspectos genéticos.....	26
1.4.1.1. Genes candidatos identificados na dislexia.....	31
1.4.1.2. Análises Genes X Cérebro.....	41
1.4.1.3 Desequilíbrio de Ligação e Estudos de Associação.....	42
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	46
1. Gerais.....	47
2. Específicos.....	47
<b>IV. CASUÍSTICA</b> .....	48
1. Avaliação clínica.....	51
1.1. Avaliação clínica dos pacientes do grupo I.....	51
1.2. Avaliação clínica dos pacientes do grupo II.....	53
<b>V. MÉTODOS</b> .....	54
1. Extração de DNA genômico de sangue periférico.....	55
2. Técnica de MLPA .....	55



---

2.1. Procedimentos para a técnica de MLPA.....	57
2.1.1. Desnaturalização do DNA genômico e hibridização com sondas.....	57
2.1.2. Reação de Ligação .....	57
2.1.3. Reações da PCR Multiplex .....	57
2.1.4. Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar.....	57
2.1.5. Análise dos dados obtidos por MLPA.....	58
2.2. O Kit de MLPA.....	58
3. Estudo do gene candidato <i>DYX1C1</i> .....	59
3.1. A seleção dos polimorfismos a serem estudados.....	60
3.2. Reação em cadeas da Polimerase em Tempo Real para genotipagem.....	61
3.2.1. Procedimetos para a reação de PCR em tempo real.....	62
3.2.2. Análise estatística dos dados.....	63
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
1. Dados familiares.....	65
2. MLPA.....	65
3. Estudo de associação do gene <i>DYX1C1</i> .....	70
<b>VII. DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>VIII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 1 - Genótipos dos indivíduos do grupo I e II.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>100</b>

A dislexia é definida como um distúrbio, ou transtorno de aprendizagem na área da leitura, escrita e soletração, que ocorre apesar de uma adequada inteligência e oportunidade sociocultural. A etiologia desse distúrbio se deve, em parte, a um importante componente genético. Ao todo, nove *loci* no genoma foram identificados por meio de estudos de ligação, e sete genes proeminentes foram propostos como candidatos à dislexia: *DYX1C1*, *KIAA0319*, *DCDC2*, *ROBO1*, *MRPL19*, *C2ORF3* e *KIAA0319L*, mas nenhuma mutação funcional nesses genes foi efetivamente relacionada com a causa do distúrbio até o momento. O objetivo deste estudo foi verificar a relação de dados moleculares com a manifestação do distúrbio em 49 famílias de escolares brasileiros com diagnóstico de dislexia. Para isso, foi investigada a presença de grandes deleções e duplicações em algumas regiões dos genes candidatos *DCDC2*, *KIAA0319* e *ROBO1* pela técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), utilizando o kit SALSA MLPA P150 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). E além disso, foi realizado um estudo de associação utilizando 4 SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) presentes no gene *DYX1C1*, que já haviam sido relacionados com o fenótipo na literatura. A técnica de MLPA foi aplicada pela primeira vez na pesquisa de mutações em genes candidatos para a dislexia, este método foi reprodutível e o padrão de variação total por sonda foi baixo, porém a análise não revelou nenhuma deleção ou duplicação nas regiões de ligação das sondas nos genes estudados. Algumas modificações no kit de dislexia P150 foram sugeridas ao fabricante visando o aprimoramento para estudos futuros. Na etapa seguinte, a genotipagem dos SNPs foi realizada por PCR em tempo real, e a estratégia utilizada no estudo de associação foi o Teste de Transmissão de Desequilíbrio de Ligação (TDT). Nenhuma associação foi obtida para os marcadores estudados. As aparentes discrepâncias de nossos resultados com estudos anteriores podem ser explicados pelas diferenças na definição do fenótipo, a ancestralidade da amostra, o desenho do estudo, e as interações com efeitos ambientais que diferem entre populações. Esse resultado não descarta a participação do gene *DYX1C1* na etiologia da dislexia, o aumento do número da amostra e de marcadores para estudos posteriores é fundamental para que se possa fazer uma análise mais completa do envolvimento desse gene no fenótipo, o que poderá fornecer importantes informações para o entendimento da dislexia e para futuros protocolos de diagnósticos e de conduta para os indivíduos afetados.

Dyslexia or reading disability is a learning disorder associated with difficulty in learning to read, writing and spelling, despite adequate intelligence and educational opportunities, with a significant heritable trait. At least nine loci in the genome were related through linkage studies, and seven prominent genes were associated with dyslexia: *DYX1C1*, *KIAA0319*, *DCDC2*, *ROBO1*, *MRPL19*, *C2ORF3* and *KIAA0319L* but no functional mutation in these genes was indeed related with the disorder cause so far. The intent of this study was access the contribution of these genes in the learning disorder molecular etiology, in a sample 49 families of dyslexic Brazilian individuals. Large deletions and duplications in the candidate genes *DCDC2*, *KIAA0319* and *ROBO1* were investigated by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique, using the SALSA MLPA P150 kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). In addition, an association study was performed using 4 SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) in *DYX1C1* gene, which had already related to the phenotype in the literature. The MLPA technique was applied for the first time in the search for candidate genes mutations in dyslexia, this method was reproducible and the overall standard variation per probe was low, but the analysis revealed no deletion or duplication in probes binding regions in the studied genes. Some modifications in the SALSA MLPA P150 kit have been suggested to the manufacturer attempting to improve it for future studies. In the next stage, SNPs genotyping was performed by real time PCR, and the strategy used in the association study was the Transmission Disequilibrium Test (TDT). No association was obtained for the markers. The apparent discrepancies of our results with previous studies can be explained by phenotype definition differences, the sample ancestry, study design, and interactions with environmental effects that differ between populations. This result does not rule out the involvement of *DYX1C1* gene in the dyslexia etiology, the increase of the sample and markers numbers for future studies is essential to make a more complete analysis of this gene involvement in phenotype, which may provide important information to the dyslexia understanding and future diagnostic protocols and conduct for affected individuals.

*“Fui totalmente desestimulado em meus dias de escola. E nada é mais desencorajador do que ser marginalizado em sala de aula, o que nos leva a sentirmo-nos inferiores em nossa origem humana”*

Winston Churchill: estadista britânico, disléxico, ganhador do prêmio nobel de literatura em 1953.

## **I. INTRODUÇÃO**

---

Em nossa sociedade, cada vez mais o domínio da linguagem escrita é essencial para se obter sucesso, pois grande parte das informações são fornecidas por meio da palavra escrita. A maioria das pessoas que se comunicam através desta linguagem são capazes de realizar a leitura sem esforços e de forma tão simples que é quase impossível olhar uma palavra sem lê-la, tendo ou não algum significado. No entanto, muitas pessoas, têm dificuldade para atingir um nível satisfatório ou bom de leitura. E muitas vezes, isso se deve a um distúrbio de aprendizagem de origem constitucional: a dislexia.

Os estudos a respeito deste distúrbio tem se tornado, na atualidade, o tema central de muitas pesquisas em todo o mundo, não apenas relacionados ao diagnóstico clínico e aos aspectos relevantes de intervenções, mas também aos seus fatores causais. Os fatores genéticos têm ganhado um foco especial, já que importantes descobertas foram realizadas nessa área. Entretanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido na busca da etiologia da dislexia.

A seguir será realizada uma revisão da literatura abordando os tópicos mais relevantes sobre esse tema. Sua problemática, definição e classificação, bem como, os fatores envolvidos na etiologia desse distúrbio de aprendizagem dando ênfase ao aspecto genético, tema central deste estudo.

## **1.1 A Aprendizagem da Leitura**

O desenvolvimento da aprendizagem está diretamente relacionado ao da linguagem. A leitura e a escrita são as formas mais elevadas da linguagem, que exigem um processo neuropsicológico altamente complexo, cujo desenvolvimento se susenta por uma estrutura anatomofuncional geneticamente determinada e também pelo estímulo verbal dado pelo meio.

Para melhor entender como se dá o processo de aprendizagem da leitura e escrita, é necessário conhecer, de forma geral, como funciona o cérebro. Tendo em consideração que a maioria das definições sugerem que a dislexia se deve a alterações no sistema nervoso central, faremos uma breve abordagem ao que a literatura refere sobre os diferentes substratos neurológicos envolvidos na leitura, e suas funções nessa tarefa complexa.

## **1.2 O Cérebro e a Linguagem**

Para compreender como a linguagem está localizada, nós temos que considerar primariamente o córtex cerebral. O córtex de cada um dos dois hemisférios é dividido em quatro

lobos anatomicamente distintos: frontal, parietal, occipital e temporal (Figura1). Estes lobos são especializados em sua função. Segundo Kandel e Schwartz (1985), o lobo frontal está amplamente relacionado com o planejamento e com o movimento, o parietal com sensação somática, o occipital com a visão e o temporal com a audição, bem como a aprendizagem, memória e emoções. Cada lobo tem circunvoluções características e dobras. As cristas das circunvoluções são denominadas giros. As ranhuras são chamadas sulcos ou fissuras.

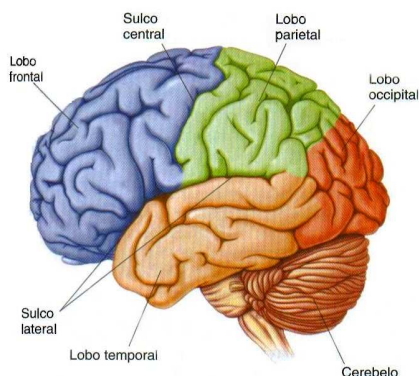


Figura 1 - Representação do Córtex Cerebral. (Adaptado de : <http:// unisinos.br> - acesso em nov/2010).

Muito do que se conhece sobre a localização da linguagem vem de estudos de afasias (distúrbios na percepção e expressão da linguagem). Broca (1861) descreveu o caso de um paciente que tinha perdido a capacidade de falar embora pudesse compreender a linguagem. Ele não podia formar sentenças fluentes nem expressar suas ideias na escrita. O exame de seu cérebro, após a morte, mostrou uma lesão na porção posterior do lobo frontal esquerdo (Dronkers, 2007), uma área atualmente conhecida como área de Broca.

Carl Wernicke, em 1876, descreveu um outro tipo de afasia, que envolve um comprometimento da compreensão mais que da execução (uma má função receptiva, opondo-se à expressiva). Ele descobriu que este novo tipo de afasia tinha uma localização diferente daquela descrita por Broca, a lesão estava localizada na parte posterior do lobo temporal, no giro temporal superior esquerdo.

Wernicke postulou que a linguagem envolve regiões sensoriais e motoras separadas. Ele propôs que a área de Broca controla o programa motor para coordenar os movimentos da boca em fala coerente, e ele atribuiu à área do lobo temporal que ele havia descoberto, a função de seleção de palavras. (Kandel et al., 1997). Atualmente, pesquisadores reviram a ideia inicial de

Wernicke, e o que se sabe no momento é que o modelo conexionista para a linguagem tem a participação de um circuito inter-hemisférico (Lent, 2005).

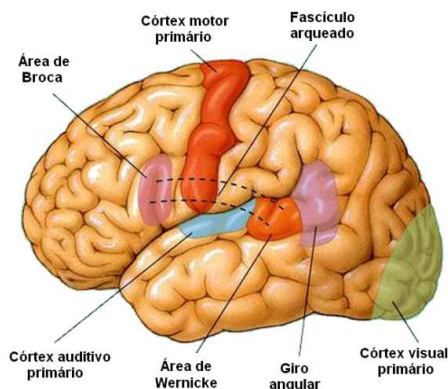


Figura 2 - Áreas envolvidas no modelo Wernicke-Geschwind (Adaptado de: <[http:// web.gc.cuny.edu](http://web.gc.cuny.edu)>. Acesso em: nov/2010).

Segundo Andrade, Di Bernardi e Barros (2004), para que ocorra a leitura, as regiões occipital e parietal são responsáveis pelo processamento de símbolos gráficos e organização visuoespacial da grafia, respectivamente. Consecutivamente, estas informações são reconhecidas e decodificadas na área de Wernicke, onde haverá a compreensão da linguagem e ativação do córtex motor primário e da área de Broca.

O uso de técnicas de imagem cerebral confirmam esses achados (Figura 3) , e indicam que as tarefas que exigem decodificação fonológica, como, por exemplo, a leitura de palavras inventadas, levam ao aumento da ativação da porção posterior do lobo temporal superior. Já as palavras reais levam ao aumento da ativação da área occipito-temporal. Esse circuito parece participar do sistema de reconhecimento da forma visual (lexical) da palavra. Há, ainda, um circuito anterior, centralizado no giro frontal inferior esquerdo, e que participa dos processos fonológicos e articulatórios da leitura e, por isso, está envolvido na leitura silenciosa e na nomeação (Pugh et al., 2000; Simos et al., 2002).



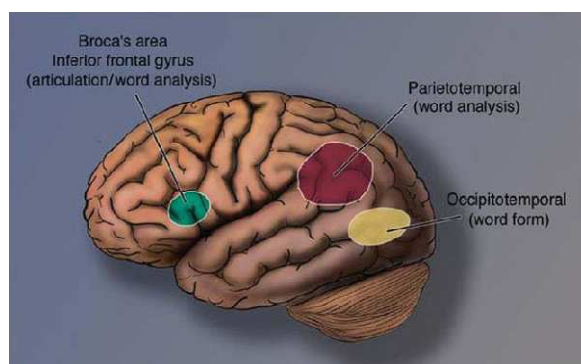


Figura 3 - Áreas envolvidas na leitura. Três sistemas neurais para leitura são ilustradas na superfície do hemisfério esquerdo: um sistema anterior na região do giro frontal inferior (área de Broca), e dois sistemas posteriores, um na região parieto-temporal, e um segundo na região occipito-temporal (extraída de Shaywitz e Shaywitz, 2008).

Embora vários fatores possam influenciar a aprendizagem de uma criança, existem determinadas alterações, de origem orgânica, que prejudicam a aquisição e o desenvolvimento da leitura e da escrita.

Os distúrbios de leitura foram primeiramente identificados no início do século XIX a partir do estudo de adultos com lesão cerebral. Referiam-se, portanto, a quadros de dislexia adquirida, em que o problema de leitura é devido a lesão cerebral ocorrida após a alfabetização (Novick e Arnold, 1988). Ou seja, na dislexia adquirida, as habilidades de leitura/escrita, já normalmente desenvolvidas, são perdidas como resultado de uma lesão no cérebro.

É importante diferenciar, então, a dislexia adquirida da dislexia de desenvolvimento, na qual o fracasso na aquisição da completa competência na leitura/escrita é de origem constitucional, (Pinheiro, 1995; Spreen, Risser e Edgel, 1995). No item a seguir serão abordados os principais aspectos da dislexia do desenvolvimento, sua definição, etiologia e classificação.

### 1.3 Dislexia do desenvolvimento

Conforme já mencionado, na dislexia do desenvolvimento não há uma lesão cerebral evidente, e a dificuldade surge durante a aquisição da leitura pela criança. Em uma descrição histórica da dislexia do desenvolvimento, Rotta e Pedroso (2006) descrevem que em 1872 foi utilizado pela primeira vez o termo *dislexia* por Kerr. Em 1884, Reinhold Berlin a definiu como uma condição que ocorria quando um indivíduo de inteligência normal tinha dificuldade para a leitura. Nesta época, a dislexia foi associada ao hemisfério esquerdo do cérebro, porém os pesquisadores estavam concentrados na possibilidade de ser um problema primariamente visual.

### 1.3.1 Definição atual

A dislexia do desenvolvimento é um distúrbio neurológico, com um importante componente genético (Taipale et al., 2003), que prejudica, especificamente, a aprendizagem da leitura. Sua característica fundamental é a dificuldade para adquirir fluência na leitura de palavras, e baixa habilidade de soletração e decodificação (Pugh et al., 2000; Eden e Moats, 2002; Lyon et al., 2003). A fluência na leitura é mais comumente definida como a habilidade de ler textos rapidamente, precisamente, e com expressão apropriada. Para leitores não-fluentes, o processo da leitura é laborioso e lento, e eles geralmente possuem dificuldade na aprendizagem do conteúdo lido. (National Reading Panel, 2000; Kuhn e Stahl, 2003).

Em 2003, o Comitê da Associação Internacional de Dislexia revisou a proposta de Lyon et al. (2003) em definir a dislexia como um transtorno específico de aprendizagem, de origem neurobiológica, caracterizada por difícil reconhecimento fluente de palavras e poucas habilidades de ortografia e decodificação. Essas dificuldades são resultantes de uma deficiência no componente fonológico da linguagem, inesperado quando comparado com a instrução efetiva na sala de aula, outras habilidades cognitivas, adequada inteligência e oportunidade sociocultural. Como consequência podem surgir problemas na compreensão da leitura, impedindo a aquisição do vocabulário e do conhecimento em geral.

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-IV-TR (2002) o rendimento na leitura, medido por testes padronizados, de correção ou compreensão de leitura, está acentuadamente abaixo do nível esperado, considerando a idade cronológica, a medida da inteligência e o nível escolar, próprios da idade do indivíduo. A característica da leitura, tanto silenciosa como oral, nestes indivíduos é marcada por distorções, substituições ou omissões, em que predominam a lentidão e os erros na compreensão.

Salgado et al. (2006) descreveram as principais características observadas nas crianças com dislexia como: alterações na velocidade de nomeação de material verbal e memória fonológica de trabalho, dificuldades em provas de consciência fonológica (rima, segmentação e transposição fonêmicas), nível de leitura abaixo do esperado para a idade e o nível de escolaridade, escrita com trocas fonológicas e ortográficas, bom desempenho em raciocínio aritmético, nível intelectual na média ou acima da média, déficits neuropsicológicos em funções perceptuais, memória, atenção sustentada visual e funções executivas.

As crianças com dislexia frequentemente possuem distúrbios associados (comorbidades) em domínios conexos, tais como a aquisição da linguagem oral (disfasia), habilidades na escrita (disgrafia e erros ortográficos), habilidades matemáticas (discalculia), coordenação motora (dispraxia), a estabilidade postural e destreza, orientação temporal (discronia), habilidades visuoespaciais (síndrome do desenvolvimento do hemisfério direito), e as habilidades de atenção (hiperatividade e transtorno de déficit de atenção) (Weintraub e Mesulam, 1983; Rapin e Allen, 1988; Dewey, 1995; Fawcett et al., 1996; Gross-Tsur et al., 1996).

#### 1.4.1 Aspectos neurobiológicos

Os primeiros especialistas que consideraram a dislexia um distúrbio de base neurobiológica foram os médicos oftalmologistas. Alguns profissionais passaram a questionar porque certos sujeitos hábeis em diferentes atividades com inteligência normal ou mesmo superior e com desenvolvimento dentro do esperado em situações do seu cotidiano não conseguiam desenvolvimento normal ao iniciarem o aprendizado da leitura e escrita (Doyle, 1996).

James Hinshelwood, em 1917, citou a dislexia na publicação de sua monografia sobre “cegueira verbal congênita” ao pesquisar adultos afásicos, encontrou crianças com sintomas muito parecidos, possivelmente hereditários, e constatou ser mais frequente em meninos. Em 1925, Samuel Orton observou que a dificuldade em leitura da dislexia aparentemente não estava correlacionada com dificuldades estritamente visuais (Henry, 1998). Ele acreditava que essa condição era causada por uma falha na lateralização do cérebro (Orton, 1928).

A hipótese referente à especialização dos hemisférios cerebrais de Orton foi alvo de novos estudos na década de 1980 e 1990, estabelecendo que o lado esquerdo do *planum temporale*, o qual é a extensão posterior da área de Wernicke, responsável pela recepção da linguagem (Steinmetz, 1996), é fisicamente maior que a região direita nos cérebros da grande maioria pessoas não disléxicas; nas pessoas disléxicas, contudo, essas regiões são simétricas ou mesmo ligeiramente maiores no lado direito do cérebro (Galaburda et al., 1985; Howard et al., 1992; Galaburda et al., 1994; Sun e Walsh., 2006).

Galaburda e Kemper (1979) também observaram, um número aumentado de neurônios ectópicos, microgirias e outras anormalidades menores no córtex cerebral, do hemisfério cerebral esquerdo de disléxicos. As ectopias consistem em cerca de 50-100 neurônios e células gliais que escaparam para a camada molecular do córtex através de uma brecha na membrana limitante glial

externa, acompanhado de leve desorganização das camadas corticais subjacentes. As microgírias são os defeitos mais graves, onde a organização de todas as camadas do córtex é severamente afetada. Anomalias citoarquitetônicas também foram observadas no tálamo de disléxicos: no núcleo geniculado lateral, as camadas magnocelular eram mais desorganizadas, com corpos celulares menores (Livingstone et al., 1991).

Uma extensa quantidade de trabalhos posteriores foram realizados utilizando métodos de imagem *in vivo*. Estes últimos estudos, no entanto, têm rendido resultados menos claros do que o esperado, mas, globalmente confirmou algumas sutis diferenças na anatomia do cérebro de disléxicos, cujo significado exato ainda está sob investigação (Beaton, 1997; Morgan and Hynd, 1998; Shapleske et al., 1999).

Ao contrário de outras técnicas de exame neurológico, a neuroimagem funcional não é invasiva e, por isso, pode ser usada sem restrições em estudos com a população infantil. Dois métodos de neuroimagem funcional têm sido muito utilizados com crianças: a Imagem por Ressonância Magnética Funcional (fMRI) e, mais recentemente, a Imagem de Fonte Magnética (MSI). A Ressonância Magnética Funcional (fMRI) registra o fluxo sanguíneo e as mudanças no metabolismo regional cerebral que ocorrem em função de diferentes graus de ativação das estruturas cerebrais que participam de tarefas cognitivas específicas. A Imagem de Fonte Magnética (MSI) proporciona um mapa espaço-temporal e tridimensional da atividade elétrica do cérebro em tempo real, por meio do registro da atividade de grupos de neurônios que participam da realização de uma tarefa (Simos et al., 2002).

Um estudo feito com fMRI demonstrou que os leitores com dislexia apresentavam atividade reduzida na região posterior do hemisfério cerebral esquerdo, a qual conecta o córtex visual e a área de associação visual às áreas da linguagem, conforme apresentado na Figura 4, e atividade aumentada nas áreas homólogas do hemisfério contralateral (Horwitz et al., 1998; Shaywitz et al., 2003). Vários estudos também têm demonstrado atividade reduzida nas regiões temporo-parietais esquerdas (incluindo os giros angular e supramarginal), em tarefas de leitura de palavras, leitura de pseudo-palavras e rima de letras (Simos et al., 2000; Temple et al., 2001), e regiões occipito-parietais esquerdas em tarefas de combinação de letras (Temple et al., 2001). Entretanto, os disléxicos não apresentam um nível anormal de ativação na área frontal inferior esquerda (Rumsey et al., 1991).

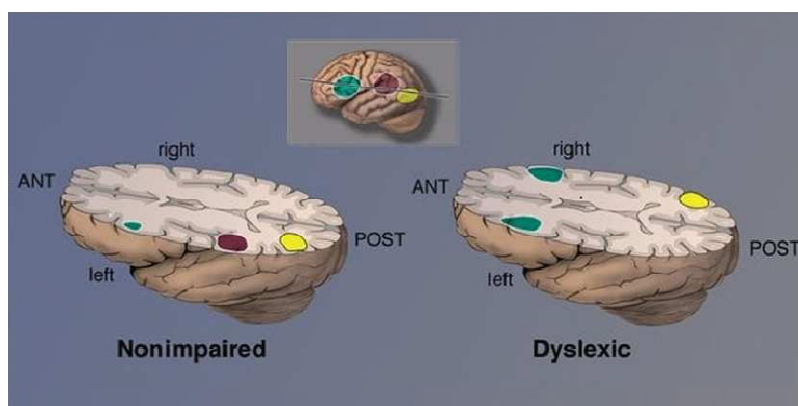


Figura 4 - Padrões de atividades cerebrais em tarefas de leitura. Os hemisférios esquerdo e direito de indivíduos disléxicos (direita) e não disléxicos (esquerda) são representados (extraída de Shaywitz e Shaywitz, 2008).

É interessante observar que os padrões anormais de atividade cerebral observados na dislexia são consistentes em diferentes culturas. Paulesu et al. (2001), por exemplo, avaliaram disléxicos italianos, franceses e ingleses com tomografia por emissão de pósitrons e constataram que os italianos foram o grupo com menor comprometimento na leitura, provavelmente por causa da língua italiana que tem uma ortografia mais “transparente” (regular) do que as outras duas línguas. Apesar disso, os três grupos apresentaram dificuldade em tarefas fonológicas e reduzida ativação do hemisfério cerebral esquerdo (giros temporais médio, superior e inferior e giro occipital médio). Portanto, é possível que a base neurocognitiva da dislexia do desenvolvimento seja universal, apesar das diferenças existentes na estrutura fonológica das diversas línguas.

### 1.3.2 Prevalência

A prevalência deste distúrbio de aprendizagem na população geral é estimada em cerca de 5% a 10% (Bates et al., 2010), outros autores ainda consideraram taxas de 5% a 17%, (Shaywitz e Shaywitz, 2005). Uma estimativa de prevalência é específica para uma determinada amostra e para a definição utilizada no estudo, dependendo principalmente dos critérios de diagnóstico utilizados.

Snowling (2004) descreveu que a prevalência de dislexia em uma população depende fundamentalmente do limite que se toma como indicador de uma capacidade de leitura. Segundo o DSM-IV (2002) a prevalência nos Estados Unidos é de aproximadamente 4% das crianças escolares. No entanto, em países onde os critérios diagnósticos são mais rígidos estas estatísticas

podem ser ainda menores tanto em incidência como em prevalência. No Brasil, ainda não há um estudo oficial sobre a prevalência da dislexia.

Alguns autores apontam que nas línguas em que existe maior correspondência entre a letra (grafema) e o som que ela representa (fonema), a prevalência da dislexia é menor. Capovilla (2002) afirma que na língua inglesa, cuja ortografia tem relações grafofonêmicas bastante irregulares, com correspondências imprevisíveis entre letras e sons, as crianças possuem mais dificuldade na leitura do que no português, cujas relações entre letras e sons são bem mais regulares e que, portanto, propicia maior sucesso na aplicação de regras de conversão grafofonêmica. Segundo Démonet, Taylor e Chaix (2004), na Itália, que apresenta uma ortografia “quase-transparente”, a dislexia não se manifesta na forma de imprecisão na decodificação, mas de lentidão na leitura

Considerando o fator gênero, muitas alterações de linguagem têm sido descritas como mais comuns em meninos do que em meninas, sendo a dislexia uma delas. Evidências epidemiológicas confirmam que há mais meninos disléxicos que meninas, como a observação clínica tem indicado (Schaywitz et al., 1990; Flannery et al., 2000; Rutter et al., 2004). A teoria hormonal proposta por Geschwind (1982) é uma possível explicação para o fato. Segundo essa teoria, a dislexia estaria ligada à produção excessiva de testosterona na fase da gestação, impedindo o desenvolvimento do hemisfério esquerdo do cérebro. Estes fenômenos ocorreriam principalmente no sexo masculino, devido a um desenvolvimento mais lento desse hemisfério.

Entretanto, alguns estudos (Flynn e Rahbar, 1994; Pennington, 2000) não mostram diferenças significativas na frequência de dificuldades de leitura entre os sexos. Outro ponto de vista proposto por Shaywitz et al. (1992) é que as diferenças previamente reportadas poderiam ocorrer devido às práticas de encaminhamento feitas pelos professores, nas quais os meninos, cujas dificuldades escolares acompanham-se geralmente por problemas de comportamento, seriam mais frequentemente indicados para avaliação. As meninas com dificuldades de leitura similares, mas sem problemas de comportamento em sala de aula, não chamariam tanto a atenção dos professores, embora elas tenham a mesma probabilidade que os meninos de apresentarem um distúrbio de aprendizagem.

### 1.3.3 Teorias sobre a dislexia do desenvolvimento

Existem várias teorias a respeito da fisiopatologia da dislexia. As mais citadas são a teoria do déficit fonológico, a teoria magnocelular e a teoria cerebelar. Uma breve descrição de cada uma dessas teorias será feita a seguir.

Estudos neuropsicológicos forneceram evidências consideráveis de que o mecanismo principal que conduz às dificuldades de aprendizagem destas crianças é de natureza fonológica, isto é, um defeito básico na segmentação e manipulação de fonemas da fala. A aquisição da leitura requer que a criança adquira consciência fonológica, ou seja, a habilidade de identificar e manipular mentalmente os sons (Eden e Moats, 2002). Vários pesquisadores (Godfrey et al., 1981; Werker e Tees, 1987; Reed, 1989) descobriram que os disléxicos têm mais dificuldades do que os controles pareados por idade (e também do que os controles, pareados por idade de leitura) em tarefas que requerem tratamento de diferenças sutis entre os fonemas que são acusticamente semelhantes entre si.

Uma teoria discutida é que o distúrbio no processamento fonológico, observado na criança disléxica, é o reflexo de um déficit no processamento e na integração de sinais auditivos rápidos, sucessivos e transientes no sistema nervoso. Em função desse déficit, os disléxicos não conseguem discriminar as pistas acústicas necessárias para distinguir os fonemas e, por isso, não conseguem desenvolver representações fonológicas (Tallal, 1980; Farmer et al., 1993; Nagarajan et al., 1999; Tannock et al., 2000; McArthur et al., 2001).

Os defensores da teoria magnocelular não contestam a hipótese de que os disléxicos apresentem problemas fonológicos, mas acreditam que déficits visuais e auditivos contribuem, de forma independente, para a dificuldade de leitura (Ramus, 2003). A leitura requer um rápido e preciso processamento de estímulos visuais e auditivos, os quais são realizados por neurônios gigantes e especializados, conhecidos como magnocélulas (Stein e Talcott, 1999). Estudos têm demonstrado que os disléxicos do desenvolvimento apresentam baixo limiar para estímulos de baixo contraste, de baixas frequências espaciais ou temporais e pobre sensibilidade ao movimento visual em função de um leve prejuízo no desenvolvimento das magnocélulas visuais (Stein e Walsh, 1997; Stein e Talcott, 1999; Stein, 2000). Como fundamento para essa teoria, foram observadas anomalias citoarquitetônicas em disléxicos: as camadas magnocelulares eram mais desorganizadas, com corpos celulares menores (Livingstone et al., 1991).

Nicolson et al. (2001), propuseram; a ideia intrigante de que deficiências na leitura e escrita de crianças com dislexia são causadas por distúrbios do desenvolvimento cerebelar, considerado crítico para desenvolvimento da capacidade em realizar tarefas. A teoria do déficit cerebelar explica as dificuldades motoras frequentemente associadas com a dislexia, reconhecendo que o cerebelo é importante no controle do movimento e na automação de tarefas. (Fawcett, Nicolson e Dean , 1996; Haslum e Miles, 2007).

Um argumento fundamental contra cada teoria é que elas podem explicar apenas uma proporção dos indivíduos com dislexia, e que alguns disléxicos não possuem outras deficiências periféricas frequentemente descritas por elas (Ramus et al., 2003). De fato, é inteiramente possível que cada teoria possa corresponder a diferentes subconjuntos da dislexia, resultantes de diferentes etiologias, se consideramos a origem genética ou ambiental do distúrbio.

#### **1.3.4 Classificação da Dislexia**

Embora se considere a estrutura linguístico-cognitiva individual da criança, o desenvolvimento da leitura é marcado por fases ou níveis. Com base nesses níveis de leitura, alguns tipos de dislexia foram propostos. Boder (1973) propôs dois tipos de dislexia: a dislexia superficial e a fonológica. A primeira representa dificuldades no aspecto ortográfico da leitura, ou seja na análise das palavras em grupos de letras e morfemas. Já a dislexia fonológica é marcada por alterações no componente fonológico da leitura, e a criança tem dificuldade na conversão da palavra escrita ao som que ela representa (Ellis, 1995). Boder (1973) ainda propôs a existência de mais um tipo, a dislexia mista, quando ambos os tipos citados acima estão presentes. É o tipo mais grave e exige um esforço ainda maior para estimular ambas as vias, já que a dificuldade ocorre na rota fonológica e lexical.

#### **1.3.5 Diagnóstico**

As dificuldades na aprendizagem de leitura/escrita são muito diversas. Nem toda dificuldade de leitura é uma dislexia e o diagnóstico deve ser feito por uma equipe multidisciplinar formada por profissionais experientes. O diagnóstico tem o caráter exploratório visando oferecer informações detalhadas sobre a natureza da dificuldade de aprendizagem permitindo ao profissional determinar o tipo mais adequado de intervenção.

Para diagnosticar a dislexia do desenvolvimento, deve ser excluída a presença de alguns outros distúrbios. Segundo Tallal et al. (1997), a dislexia do desenvolvimento caracteriza-se por



um distúrbio na linguagem expressiva e/ou receptiva que não pode ser atribuído ao atraso geral do desenvolvimento, a distúrbios auditivos, a lesões neurológicas importantes (como paralisia cerebral e epilepsia) ou a distúrbios emocionais.

O processo diagnóstico tem seu início com o levantamento de informações junto aos pais e professores sobre o desenvolvimento da linguagem da criança, a ocorrência de sinais sugestivos da presença de transtornos de aprendizagem e da análise do meio no qual o problema da criança está ocorrendo, seguido de levantamento das habilidades e dificuldades cognitivo-linguísticas que a criança apresenta. Para isso, segundo Capovilla e Capovilla (2004), é necessário o uso de procedimentos que investiguem o desempenho da criança em atividades de leitura, escrita e raciocínio lógico matemático, comparando-o com a idade e a escolaridade de seu grupo-classe, e também o processo cognitivo e o processamento da linguagem/aprendizagem, por meio de testes com normas de referência que permitam a análise do padrão do erro apresentado pela criança.

Um dos maiores problemas no diagnóstico da dislexia é que não existem testes sanguíneos específicos ou resultados de imagens cerebrais que garantam o diagnóstico. Fundamentalmente, a questão é, que nos testes de leitura não existe um limiar exato que divida claramente os indivíduos em grupos de disléxicos e não disléxicos. E esse limiar varia de estudo para estudo (Rayner et al., 2001).

### 1.3.6 Intervenção na dislexia

Fundamentos teóricos testados em pesquisas, têm conduzido à criação de remediação para o tratamento de distúrbios de leitura e escrita. Vários estudos conduzidos em diferentes países têm demonstrado que a intervenção facilita a alfabetização, diminuindo a incidência de dificuldades de leitura e escrita (Ball e Blachman, 1991; Byrne Fielding, 1991).

Segundo Capovilla (2002), dois métodos de alfabetização são especialmente indicados para os indivíduos disléxicos: o método multissensorial e o método fônico. Enquanto o método multissensorial é mais indicado para crianças mais velhas, que já possuem histórico de fracasso escolar, o método fônico é indicado para crianças mais jovens com risco para a dislexia e deve ser introduzido logo no início da alfabetização, de forma a diminuir a severidade de problemas futuros.

Estudos mostram ainda que, quanto maior a idade da criança e, portanto, quanto mais tempo se passa com a dificuldade de leitura e escrita, menores são os efeitos da intervenção

(Cunningham, 1990; Ball e Blachman, 1991). Portanto, é essencial intervir o mais precocemente possível, prevenindo posteriores problemas na aquisição de leitura e escrita.

#### 1.4 Contexto Multifatorial da Etiologia Dislexia

Segundo Frith (1997), a dislexia pode ser compreendida como sendo resultante de uma interação entre aspectos biológicos, cognitivos e ambientais que não podem ser separados uns dos outros. Ainda Frith explica que, num primeiro momento, condições biológicas (como os aspectos genéticos), em interação com condições ambientais (como a exposição a toxinas ou a baixa qualidade da nutrição da mãe durante a gestação), podem ter efeitos adversos sobre o desenvolvimento cerebral, predispondo o indivíduo a distúrbios do desenvolvimento. Num segundo momento, este desenvolvimento neurológico não-usual pode levar a sutis alterações no funcionamento cognitivo. Num terceiro momento, esta alteração cognitiva poderá levar a padrões específicos de desempenho comportamental. Tais padrões poderão ou não consistir em problemas de leitura e escrita, dependendo de fatores ambientais como o tipo de ortografia e o tipo de instrução ao qual a criança está exposta.

O quadro do disléxico torna-se evidente através da junção de diversos fatores. Por exemplo, certas alterações neurológicas podem afetar o desenvolvimento cerebral e, conseqüentemente, prejudicar o processamento fonológico. Mas segundo Frith (1997), tais alterações somente levarão ao quadro de dislexia se o indivíduo estiver exposto a uma ortografia que mapeie a fala no nível fonêmico. Se este indivíduo estiver exposto a uma ortografia ideomorfêmica (como o chinês, por exemplo), provavelmente ele não apresentará maiores dificuldades na aquisição de leitura e escrita, visto que em tais ortografias o processamento fonológico é menos importante e a maior demanda está sobre o processamento visual.

##### 1.4.1 Aspectos genéticos

Estima-se que 40 a 70% dos casos de dislexia tenham origem genética, portanto, o histórico familiar é o maior fator de risco (Gayan e Olson, 2003; Shaywitz e Shaywitz, 2003). Estudos baseados em famílias e com gêmeos mostraram que a dislexia do desenvolvimento é herdável e complexa, envolvendo múltiplos fatores, tanto genéticos quanto ambientais. Estudos de ligação identificaram no genoma alguns *loci* relacionados com este transtorno de aprendizagem.

No começo do século XX ficou evidente o componente hereditário da dislexia, porém isso foi comprovado somente em 1950 quando Hallgren descreveu uma família numerosa com esse transtorno. Estudos realizados em indivíduos gêmeos demonstraram o forte componente genético pelo fato de afetar em maior número os gêmeos monozigóticos (68%) do que os dizigóticos (38%) (DeFries e Alarcon, 1996). Gilger et al. (1992) demonstraram que 20-33% dos irmãos de indivíduos afetados, com pais normais, também são afetados. Esta taxa aumenta para 54-63% se um dos pais também for afetado, e ainda para 76-78% se ambos os pais forem disléxicos.

Devido à heterogeneidade genética observada, a dislexia mostra-se com um padrão complexo de herança, diferindo dos padrões clássicos mendelianos. Dados familiares apontam contra um padrão ligado ao X, ou mesmo para um padrão recessivo de herança. Segundo Pennington et al. (1991), seria mais consistente um componente aditivo com um importante locus autossômico dominante devido à alta e similar recorrência entre pais e irmãos dos indivíduos afetados. Apesar do aspecto multifatorial, provavelmente existam genes importantes atuando no *background* do indivíduo, explicando assim, os achados em estudos de grandes famílias afetadas.

Em 1997, Gayan et al. começaram a examinar a herdabilidade relativa dos déficits de leitura nos subtipos de dislexia do desenvolvimento, usando medidas ortográficas e fonológicas em um estudo com gêmeos. Castles (1999) descobriu que os déficits de leitura eram significativamente herdáveis em ambos os subgrupos de disléxicos (fonológicos e de superfície). No entanto, a contribuição genética para o déficit de leitura foi muito maior no grupo de disléxicos fonológicos do que nos disléxicos de superfície. A descoberta da etiologia genética diferencial entre os subtipos sugere que há pelo menos independência parcial no desenvolvimento dos processos cognitivos envolvidos na leitura.

Muitos estudos genéticos da dislexia centraram-se sobre o que poderia ser referido como déficit 'global', usando diagnósticos gerais ou análises quantitativas dos índices globais de gravidade (por exemplo, com base nos escores em testes padronizados de reconhecimento de palavra ou na capacidade de ortografia). Recentemente, um movimento tem surgido no sentido do uso de abordagens complementares, nas quais o perfil dislexia é dissecado em distintos, mas relacionados, componentes fenotípicos. Esta dissecação é impulsionada por teorias sobre a natureza do processo da leitura, mas a validade do uso de tais componentes hipotéticos é bem suportado pela psicologia-cognitiva e estudos psicométricos.

A principal abordagem utilizada para identificação de regiões cromossômicas (*loci*) com possível papel na dislexia foi o estudo de ligação em famílias afetadas. Os estudos de ligação referem-se à análise dos indivíduos para quais as relações familiares são conhecidas, e é usado em primeira instância, para identificar grandes regiões do genoma que contêm dezenas ou centenas de genes potenciais candidatos. Os estudos de ligação avaliam a frequência de recombinação entre marcadores genéticos polimórficos cujas localizações já são conhecidas (microsatélites, por exemplo) e certas regiões do DNA em várias gerações familiares com indivíduos portadores da característica de interesse.

Até o momento, 9 *loci* relacionados com a dislexia foram localizados no genoma: *DYX1*(15q21), *DYX2* (6p21), *DYX3* (2p16-p15), *DYX4* (6p13-q16), *DYX5* (3p12-q12), *DYX6* (18p11), *DYX7* (11p15), *DYX8* (1p34-p36) e *DYX9* (Xp27). A seguir serão descritos os *loci* de suscetibilidade à dislexia do desenvolvimento que foram identificados até o momento, dando enfoque aos principais estudos que revelaram o envolvimento dessas regiões nesse distúrbio.

### ***DYX1***

A primeira indicação do locus *DYX1* se deu através de um estudo de ligação feito com famílias americanas que segregavam com a dislexia, baseado no heteromorfismo na região centromérica do cromossomo 15 (Smith et al., 1983). Infelizmente, estudos posteriores não foram capazes de replicar essa ligação (Bisgaard et al., 1987; Rabin et al., 1993; Cardon et al., 1994). No entanto, um locus alternativo no cromossomo 15, a partir de 15q15.1 até 15q21.3, ganhou o apoio de cinco estudos de ligação independentes (Fulker et al., 1991; Smith, Kimberling, Pennington, 1991; Grigorenko et al., 1997; Schulte-Korne et al., 1998; Chapman et al., 2004; Schumacher et al., 2008).

Evidência de ligação foi encontrada para a leitura de palavras, em amostras dos Estados Unidos (Grigorenko et al., 1997). Uma amostra alemã, entretanto, mostrou evidências de ligação para a ortografia (Schulte-Korne et al., 1998). Dois estudos de desequilíbrio de ligação foram realizados na região *DYX1* utilizando marcadores curtos de repetição em tandem (Morris et al., 2000; Marino et al., 2004), e evidências positivas para a associação foi obtida para uma região de cerca de 4 MB. Nos dois estudos, um haplótipo com três marcadores foi associado em um total de três amostras independentes compostas por trios (pai, mãe e filho), sendo duas amostras de origem britânica e uma de origem italiana.

Este locus, *DYX1*, tornou-se ainda mais interessante com a descoberta de uma família finlandesa de duas gerações, em que quatro membros apresentavam problemas de leitura e co-segregavam com uma translocação equilibrada, ou seja, um rearranjo genético em que dois cromossomos quebram, e as partes destacadas são trocadas entre eles. Nessa translocação em questão, t(2; 15) (q11, q21), envolvendo a região cromossômica 15q21-22 (Nopola-Hemmi et al., 2000), a quebra do cromossomo 15 interrompia um gene, conhecido agora como gene de susceptibilidade à dislexia 1 candidato 1 (*DYX1C1*).

### ***DYX2***

Um locus de susceptibilidade à dislexia do desenvolvimento no braço curto do cromossomo 6, conhecido como *DYX2*, foi relatado por pelo menos cinco estudos independentes feitos com famílias americanas e britânicas (Cardon et al., 1994; Grigorenko et al., 1997; Fisher et al., 1999; Gayan et al., 1999; Grigorenko et al., 2000; Fisher et al., 2002; Kaplan et al., 2002;). *DYX2* está localizado na região 6p22.3-p21.3 e se estende por mais 15 MB. Foi o primeiro locus a ser replicado de forma positiva para susceptibilidade à dislexia. Muitas variantes genéticas têm sido testadas, incluindo os microssatélites e polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), e muitas associações esporádicas têm sido observadas em uma série de genes. No entanto, de todos esses estudos de *DYX2*, existem dois genes que se destacam: *KIAA0319* e *DCDC2*.

### ***DYX3***

Fagerheim (1999) realizou o primeiro rastreamento genômico em uma grande família da Noruega com dislexia, na qual se observou a ligação ao locus *DYX3*, localizado no braço curto do cromossomo 2. Os dados obtidos apontaram para a região 2p15-p16 e foram posteriormente confirmados no estudo de 97 indivíduos de origem canadense (Petryshen et al., 2002). Um outro estudo identificou um locus próximo ao *DYX3*, na região 2p11, alegadamente ligados à dislexia em uma amostra de famílias finlandesas (Kaminen et al., 2003).

### ***DYX4***

A região cromossômica 6q11–q12 foi identificada no contexto de um estudo de um amplo rastreamento genômico cromossômico (*chromosome-wide linkage study*) de uma numerosa família canadense (Petryshen et al., 2001). Os subfenótipos mais fortemente ligados foram a codificação fonológica e a ortografia. Não houve replicações posteriores de estudos independentes desses achados para o locus *DYX4*.

### ***DYX5***

O locus *DYX5* foi mapeado na região pericentromérica do cromossomo 3, baseado nos estudos de uma grande família da Finlândia, na qual o fenótipo de dislexia segregava em um padrão dominante de herança (Nopola-Hemmi et al., 2001). Dentro desta família de quatro gerações, foi deduzido que 19 dos 21 indivíduos afetados portavam um haplótipo comum que tinha cerca de 35 Mb. A ligação à dislexia foi subsequentemente identificada na região 3p13 em uma amostra britânica e na região 3q13 em uma amostra americana (Fisher et al., 2002). Além disso, em um estudo de ligação na região pericentromérica desse cromossomo, forte ligação foi encontrada para memória fonológica e em uma amostra de 77 famílias americanas (Stein et al., 2004). Uma translocação t(3;8)(p12;q11) foi identificada nesse locus e o gene *ROBO1* foi localizado por ser interrompido por ela (Hannula-Jouppi et al. 2005).

### ***DYX6***

Na região cromossômica 18p11 foi identificado o locus *DYX6*, em duas amostras familiares independente dos Estados Unidos através de uma análise do genoma por aplicação de uma abordagem de locus de traço quantitativo (QTL). A evidência mais forte de ligação foi encontrada para a leitura de palavras. Esse achado foi replicado em uma terceira amostra familiar, sendo encontrada a maior evidência de ligação para a consciência fonológica (Fisher et al., 2002). Entretanto, os resultados de uma análise multivariada de duas amostras indicaram que um QTL em *DYX6* influencia vários aspectos da habilidade de leitura e não está correlacionado com subdimensões específicas do fenótipo. (Marlow et al., 2003)

### ***DYX7***

O locus *DYX7* foi identificado por meio de dois estudos de ligação no cromossomo 11. Ambos os estudos reportaram ligação à região 11p15, especificamente em 11p15.4 em uma amostra de indivíduos britânicos (Fisher et al., 2002) e 11p15.5 em uma amostra de indivíduos canadenses (Hsiung et al., 2004). A ligação observada no último estudo pareceu apontar a região contendo o gene receptor de dopamina D4 (*DRD4*). Entretanto, a análise desse gene na amostra canadense e também em uma amostra independente de famílias italianas não mostraram nenhuma evidência de associação com a dislexia. (Marino et al., 2003; Hsiung et al., 2004).

### ***DYX8***

A existência de um locus no cromossomo 1 (*DYX8*) foi relatada por dois grupos em 1993 (Froster et al., 1993; Rabin et al., 1993). A região foi, então, delimitada por estudos em

indivíduos com translocações, segregando com o fenótipo. Mapas genéticos revelaram um consenso na região de ligação 1p36 em todos os três estudos. (Rabin et al., 1993; Grigorenko et al., 2001; Tzenova et al., 2004), porém Grigorenko et al. (2001) e Tzenova et al. (2004) também evidenciaram a ligação da região 1p34-35.

### ***DYX9***

Evidência para ligação foi encontrada na região cromossômica Xq27 (*DYX9*) em uma família holandesa (de Kovel et al., 2004). O mesmo grupo de pesquisa falhou em replicar seus resultados em 67 pares de irmãos afetados. Entretanto, evidência positiva para ligação foi encontrada na região *DYX9* em uma família do Reino Unido (Fisher, et al., 2002).

Na verdade, existem fortes evidências em 5 regiões cromossômicas: 1p, 2p, 6p, 15q e 18p. Com evidências mais fracas ficam as regiões 6q, 3p, 11p e Xq. Evidentemente, faz-se importante que outros estudos em diferentes populações sejam realizados para corroborar ou para contradizer esses dados. Estudos subsequentes de associação, feitos nesses *loci* relacionados à dislexia, abriram caminhos para identificar os genes candidatos subjacentes na maior parte destas regiões, com exceção dos *loci* *DYX4* e *DYX9*, onde genes não foram reportados. A seguir serão citados os principais genes candidatos que já foram identificados nessas regiões cromossômicas e sua possível relação com o fenótipo de dislexia.

#### **1.4.1.1 Genes candidatos identificados na dislexia**

Sete genes candidatos já foram identificados no genoma, com suporte de evidência de dois ou mais estudos independentes relacionando-os com a dislexia do desenvolvimento: *DYX1C1* no locus *DYX1*, *KIAA0319* e *DCDC2* em *DYX2*, *MRPL19* e *C2ORF3* em *DYX3*, *ROBO1* em *DYX5* e *KIAA0319L* em *DYX8*. Outros genes foram identificados recentemente no cromossomo 21, *PCNT*, *DIP2A*, *S100B* e *PRMT2*. E ainda, em 2010, foram identificados 3 genes associados à dislexia no cromossomo 18, *MC5R*, *DYM* e *NEDD4L*. Porém estes genes ainda não foram avaliados por nenhum estudo subsequente.

A identificação de grande parte dos genes propostos até o momento como candidatos à dislexia partiu da observação de translocações cromossômicas que segregavam com o fenótipo nos *loci* identificados. Atualmente, uma alternativa para a realização de uma análise mais refinada desses genes é o estudo de associação. Nesse estudo, são utilizados marcadores polimórficos específicos para o gene de interesse, e verifica-se associação quando um alelo em

particular, de um microssatélite ou polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), está presente com frequência aumentada ou reduzida nos indivíduos afetados, em comparação com controles.

Os SNPs são marcadores bialélicos resultantes de substituições de bases nitrogenadas durante a replicação do DNA, devido a processos mutacionais espontâneos e induzidos. Estes marcadores de estrutura simples são abundantes no genoma humano e constituem uma ferramenta valiosa para estudos de associação genética e identificação de genes que possam explicar a variação de fenótipos complexos (Risch e Merikangas, 1996; Goodwin, 2007).

É importante destacar que ainda não foram identificadas mutações em nenhum desses genes que efetivamente possam ser responsáveis pela doença, tornando difícil de elucidar o modo como eles contribuem para a dislexia na população. A seguir será feita uma descrição dos principais genes candidatos à dislexia já propostos:

### ***DYX1C1***

O primeiro gene mapeado foi o *DYX1C1*, candidato para a região *DYX1*, localizado no cromossomo 15q21. Foi localizado justamente porque é interrompido por uma translocação que segrega com o fenótipo de dislexia em uma família finlandesa de duas gerações (Nopola-Hemmi et al., 2000). Esse gene consiste em 10 exons, e codifica uma proteína com função ainda desconhecida, mas sabe-se que ele é expresso no cérebro e que pode estar envolvido com a migração neuronal. Vários estudos de associação foram realizados nesse gene e resultados controversos foram obtidos.

Taipale et al. (2003) observaram que *DYX1C1* codifica uma proteína com três domínios repetidos tetratricopeptídeo, que acredita-se que sejam úteis para as interações proteína-proteína. Além destes domínios, a proteína não contém nenhuma homologia com outras proteínas conhecidas. O gene é expresso em vários tecidos, incluindo o cérebro, onde a proteína é encontrada em um subconjunto de neurônios corticais e células gliais da substância branca.

Para determinar se *DYX1C1* poderia estar envolvidos na dislexia do desenvolvimento em indivíduos sem a translocação, Taipale et al. (2003) rastrearam polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), por meio de sequenciamento de DNA, em 20 indivíduos com diagnóstico de dislexia do desenvolvimento. Estes autores, então, testaram os SNPs identificados em dois grupos separados, cada um composto por pacientes e controles, o grupo I continha-se de 20 famílias não relacionadas, com 58 indivíduos disléxicos e 61 indivíduos não-disléxicos, e o segundo grupo,



era composto por 3 famílias e 33 casais de indivíduos disléxicos e não disléxicos não relacionados entre si. No primeiro grupo foi verificada associação com duas variantes, -3G/A e 1249G/T (rs3743205 e rs57809907). No segundo grupo, os autores encontraram associação mais fraca com a variante -3G/A e nenhuma associação significativa com a variante 1249G/T.

Taipale et al. (2003) propuseram, então, que ambos os SNPs poderiam estar envolvidos no fenótipo de dislexia, porque o SNP -3G/A foi localizado na sequência de iniciação de tradução e em um sítio de ligação de um fator de transcrição, e o SNP 1249G/T produziu um códon de parada prematura, apesar de apenas os quatro últimos aminoácidos serem perdidos.

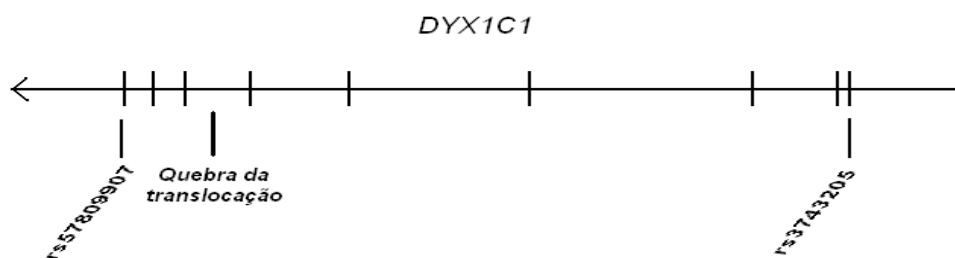


Figura 5 - Representação do gene *DYX1C1*. As barras verticais correspondem aos exons. Abaixo da figura está indicado o local da quebra da translocação, bem como dos dois SNPs associados à dislexia por Taipale et al. (2003).

Seis outros estudos tentaram replicar a associação entre *DYX1C1* e a dislexia. Dois estudos observaram associação da dislexia do desenvolvimento com os mesmos SNPs relatados por Taipale et al. (2003), mas estas associações foram na direção oposta às conclusões iniciais (Scerri et al., 2004, Wigg et al., 2004). Wigg et al. (2004), mostraram que os alelos 3G e 1249G, que são alelos mais comuns na população, foram associados com a dislexia em uma amostra de disléxicos de descendência europeia e canadense. Este estudo também identificou uma variante intrônica que foi significativamente associada. Marino et al. (2007) observaram, em uma amostra de disléxicos italianos, associação para ambas as variantes usando como traço fenotípico a memória de curta duração (*short-term memory*). Porém nenhuma associação significativa foi observada na amostra usando o diagnóstico categórico de dislexia.

Tapia-Páez et al. (2008) caracterizaram três SNPs possivelmente funcionais na região promotora de *DYX1C1* e implicaram três fatores de transcrição na regulação desse gene, sugerindo a ligação alelo-específica de TFII-I para rs3743205 e SP1 para rs16787 e rs12899331 que pôde ser verificada por ensaios de competição. Dois SNPs, rs16787 e rs3743205, mostraram

diferenças alélicas significativas em ensaios de luciferase. Assim demonstrou-se que esses fatores de transcrição formam um complexo de controle da transcrição de *DYX1C1* e que os SNPs rs3743205, rs16787 e rs12899331 têm um papel importante na ligação desses fatores de transcrição à região promotora do gene.

Dahdouh et al. (2009) buscaram explorar a contribuição de *DYX1C1* à dislexia na população alemã e analisaram uma amostra de 366 trios de famílias. Eles encontraram significância estatística para associação de um haplótipo com três marcadores G/G/G (rs3743205/rs3743204/rs600753) em uma amostra de disléxicos do sexo feminino.

Bates et al. (2010) reportaram associação desse gene com as habilidades de leitura e escrita. A análise de associação baseada em famílias foi realizada utilizando-se 13 SNPs no gene *DYX1C1*, em 790 famílias com mais de 5 descendentes. Associação significativa foi observada para a mutação missense rs17819126 para todas as medidas baseadas em leitura e soletração de processamento lexical de palavras, e para rs3743204 para leitura de palavras irregulares e pseudo-palavras. Suporte para associação não foi observado para rs3743205 e rs57809907. Esse estudo mostrou que a mutação rs17819126 é uma base funcional potencial para associação do gene *DYX1C1* com a dislexia.

Paracchini et al. (2010), detectaram sinais de associação para dois SNPs dentro do gene *DYX1C1*: rs3743205 e rs685935. A tendência de associação alélica para rs3743205 (ou "3G") foi associado com o desempenho de leitura, e em acordo com um estudo anterior (Wigg et al., 2004), apresentou tendência oposta quando comparada com o original (Taipale et al., 2003). Esses resultados sugerem que o gene *DYX1C1* poderia influenciar as habilidades de leitura e escrita com efeitos adicionais no armazenamento de informação de curto prazo.

### ***DCDC2 e KIAA0319***

A região *DYX2*, localizada no cromossomo 6p22, abriga dois *clusters* independentes de genes que estão próximos um do outro, chamados *NRSN1/DCDC2/KAAG1* e *KIAA0319/TTRAP/THEM2* (Figura 6). Ambas as regiões tem recebido suporte de diferentes estudos (Deffenbacher et al., 2004; Francks et al., 2004; Cope et al., 2005; Meng et al., 2005; Schumacher et al., 2006) e os genes *DCDC2* and *KIAA0319* se destacaram como candidatos à dislexia através de estudos de associação e de desequilíbrio de ligação (Francks, 2004; McGrath et al., 2006; Schumacher et al., 2007; Williams e O'Donovan 2006).

O gene *DCDC2* compreende 10 exons espaçados por 211kb. A evidência inicial do envolvimento desse gene na dislexia foi obtida através de mapeamento genético baseado em desequilíbrio de ligação em uma secção de 680 Kb do locus *DYX2*, em uma amostra composta por 153 famílias americanas com descendência predominante européia (Meng et al., 2005). Meng et al. (2005) também demonstraram que o RNA de interferência para *Dcdc2*, introduzido em células na zona ventricular cerebral de camundongos, resultou em uma alteração na migração dos neurônios.

Além disso, uma deleção de 2,4 kb no Intron 2 do *DCDC2*, o qual possui repetições em tandem que supostamente são sítios de ligação de fatores de transcrição, foi identificada, e obteve uma frequência de 8,5% nos pais. (Meng et al., 2005). A repetição em tandem na região deletada revelou vários alelos. Ultimamente, um estudo independente analisou o efeito da deleção em *DCDC2* sobre a morfologia do cérebro das amostras sadias (não selecionados para DD). Um aumento significativo na massa cinzenta em regiões do cérebro envolvidas na leitura foi observada em indivíduos heterozigotos para a deleção, homozigotos para a deleção eram muito raros e por isso não foram testados (Meda et al., 2008).

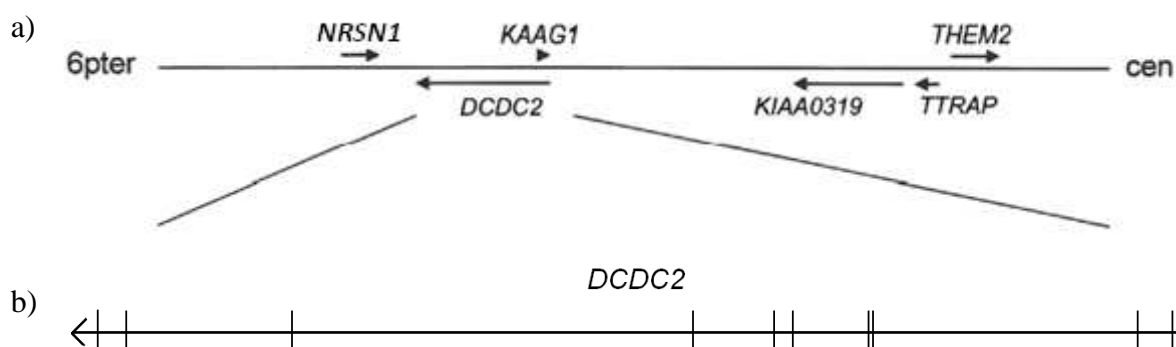


Figura 6 - Estrutura genômica do locus *DYX2*. a) Os dois grupos de genes: o *cluster* distal *NRSN1/DCDC2/KAAG1* e o mais proximal, *KIAA0319/TTRAP/THEM2*. b) Estrutura do gene *DCDC2*. (Adaptado de Schumacher et al., 2006).

Algumas notáveis variantes genéticas têm sido identificadas em *DCDC2* as quais produziram resultados mistos, quando testadas em amostras independentes. O SNP rs793862 foi associado à dislexia do desenvolvimento em quatro de seis estudos independentes (Deffenbacher et al., 2004; Meng et al., 2005; Harold et al., 2006; Schumacher et al., 2006; Brkanac et al., 2007). Um haplótipo de rs793862 e um outro SNP, rs807701, também mostraram associação significativa em dois de cinco estudos independentes (Schumacher et al., 2006). Estes dois SNPs

e seus haplótipos também foram testados em uma amostra de famílias de indivíduos com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), e também foram testados para habilidade de leitura, e revelaram associação com fenótipos atencionais, mas não com fenótipos de leitura (Couto et al., 2009).

O gene *KIAA0319* contém 21 exons e está posicionado à 180kb do *DCDC2*. Foi identificado pela primeira vez em um estudo do locus *DYX2* em amostras provenientes do Centro de Pesquisa em Distúrbios de Aprendizagem do Colorado (Kaplan et al., 2002). Quatro, de cinco estudos independentes, encontraram associação com marcadores no gene *KIAA0319* (Francks et al., 2004; Cope et al., 2005; Harold et al., 2006; Brkanac et al., 2007; Dennis et al., 2009). Embora esses marcadores estejam distribuídos através de 102 Kb do gene, existe uma tendência para associação mais significante se agrupar em torno do primeiro Intron.

Franks et al. (2004) mostraram que uma região de 77 Kb com forte desequilíbrio de ligação entre os marcadores foi associada com a dislexia em duas grandes amostras de famílias britânicas e americanas. Essa região cromossômica abrange os quatro primeiros exons do gene *KIAA0319*, o gene *TTRAP* e as sequências reguladoras do gene *THEM2*, conforme apresentado na Figura 7. Um outro estudo em uma amostra completamente independente, mostrou associação na mesma região (Cope et al., 2005).

Quatro marcadores nomeados rs4504469, rs6935076, rs2038137 e rs2143340 (localizado no gene adjacente chamado *TTRAP*), foram associados em pelo menos duas amostras independentes. Além disso, um haplótipo de risco composto por rs4504469, rs2038137 e rs2143340 (Figura 7), foi associado à dislexia em três amostras independentes de famílias britânicas (Francks et al., 2004; Cope et al., 2005; Parachini et al., 2006). Paracchini et al. (2006) examinaram a regulação da transcrição em linhagens celulares heterozigotas para esse haplótipo de risco, e mostraram que ele estava associado com a redução da transcrição do gene *KIAA0319*, mas não de seus genes vizinhos, *TTRAP* ou *THEM2*, os quais tinham sido previamente propostos como candidatos para a dislexia (Deffenbacher et al., 2004).

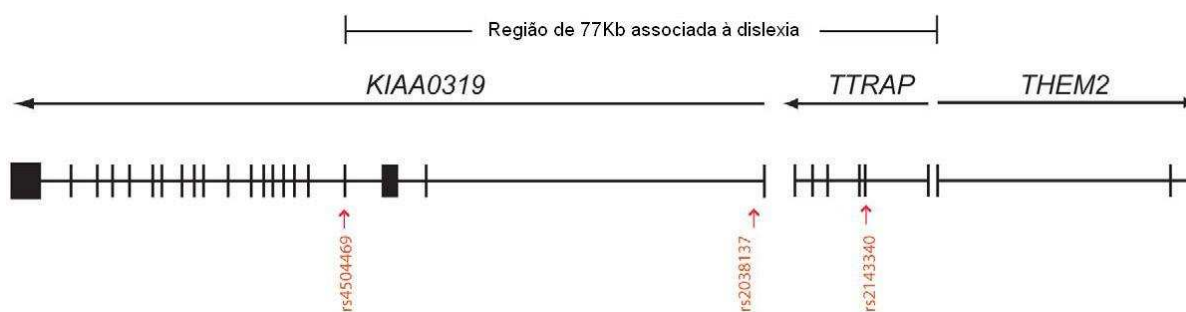


Figura 7 - Organização genômica da região cromossômica 6p e localização dos marcadores associados à dislexia. As setas indicam a orientação dos genes e as barras verticais representam os exons. (Adaptado de Paracchini et al. 2006).

Francks et al. (2004) e Cope et al. (2005) rastream *KIAA0319* para variantes de possível efeito funcional, mas nenhum grupo identificou uma variante funcional plausível, sugerindo que regiões regulatórias estavam provavelmente envolvidas. Consistente com esta hipótese, Paracchini et al. (2006) examinaram a regulação da transcrição em linhagens celulares heterozigotas para um haplótipo de um SNP de *KIAA0319* que foi associado com distúrbio de leitura. Esses autores mostraram que o haplótipo de risco estava associado com a redução da transcrição do gene *KIAA0319*, mas não de seus genes vizinhos, *TTRAP* ou *THEM2*, os quais tinham sido previamente propostos como candidatos para a dislexia (Deffenbacher et al., 2004).

Dennis et al. (2009) revelaram forte associação da dislexia com um alelo do SNP rs9461045, e demonstraram que esse alelo confere reduzida expressão de *KIAA0319* em ambas as linhagens de células neuronais e não neuronais. Além disso, observaram que a presença desse alelo rs9461045 cria um sítio nuclear ligação às proteínas, provavelmente para o silenciador transcricional OCT-1.

O envolvimento dos genes *DCDC2* e *KIAA0319* com a dislexia do desenvolvimento tem se fortalecido através de análises funcionais (Meng et al., 2005; Paracchini et al., 2006). Funcionalmente, *DCDC2* e *KIAA0319* estão envolvidos no processo de migração neuronal cortical durante o desenvolvimento cerebral. *DCDC2* é amplamente expresso no sistema nervoso central (SNC), incluindo as áreas do cérebro em que os padrões mais baixos de ativação foram observadas em indivíduos com dislexia, como o córtex temporal inferior e medial. *KIAA0319* é expresso especificamente no córtex parietal, córtex visual, e córtex occipital (Meng et al., 2005), áreas importantes na leitura (Fiez e Petersen, 1998).

Entretanto, como um fator limitante, deve ser notado que apesar de descobertas favoráveis, associações negativas foram reportadas para ambos os genes (Deffenbacher et al., 2004; Francks et al., 2004; Cope et al., 2005; Meng et al., 2005; Schumacher et al., 2006). Ainda, somente dois estudos rastrearam *DCDC2* e *KIAA0319* de uma só vez. Isso permite compreender a contribuição relativa de cada um e identificar interações possíveis entre eles.

Harold et al. (2006) realizaram uma análise combinada dos genes e *DCDC2* em duas grandes amostras do Reino Unido. Os resultados desse estudo foram um suporte significativo para a associação do gene *KIAA0319*, e nenhuma associação para o gene *DCDC2*. Outro fato interessante foi a fraca evidência de interação entre os dois *loci* quando uma análise foi feita do conjunto combinado de casos e controles de ambas as amostras. Schumacher et al. (2006) identificaram um haplótipo de risco para a dislexia no gene *DCDC2*, mas não no gene *KIAA0319*. Em um trabalho posterior, Ludwig et al. (2008) incluíram os SNPs rs4504469 e rs761100, que obtiveram evidência significativa de interação no estudo de Harold et al. (2006), e estudaram 244 famílias alemãs para testar a interação entre marcadores no gene *KIAA0319*, e os haplótipos de risco previamente identificados em *DCDC2* (rs793862-rs807701(A–C)). Foi encontrada uma associação significativa para a dimensão quantitativa “leitura de palavras”, esse subfenótipo também foi associado no estudo de Harold et al. (2006). Essas análises conjuntas, portanto, produziram evidências para uma possível interação entre *DCDC2* e *KIAA0319*.

### ***ROBO1***

O gene candidato para o locus *DYX5* foi o *ROBO1*. Esse gene possui cerca de 1 Mb de comprimento e consiste em 30 exons localizados no cromossomo 3p12, muito perto do gene *ROBO2*. O *ROBO1* foi localizado por ser interrompido por uma translocação t(3;8)(p12;q11) observada em um indivíduo disléxico de origem finlandesa. A quebra do cromossomo 3 dessa translocação foi identificada entre os exons 1 e 2 do *ROBO1*. Além disso, um haplótipo raro de 35 Mb, co-segregando com a dislexia do desenvolvimento em uma grande família finlandesa, incluía o gene *ROBO1*, e a expressão desse gene, a partir deste haplótipo específico, mostrou-se parcial ou completamente reduzida (Hannula-Jouppi et al., 2005). Milhares de SNPs já foram identificados em *ROBO1*. A avaliação limitada de alguns desses SNPs em amostras independentes não puderam provar evidência para uma associação com a DD. (Hannula-Jouppi et al., 2005)

Recentemente, um estudo interessante desenvolvido por Bates et al. (2011) analisou 538 famílias com distúrbios de linguagem, utilizando 144 tagsSNP do gene *ROBO1*. Associação significativa para a capacidade de *buffer* fonológico (um fenótipo implicado na aquisição da linguagem, e no distúrbio de fala e linguagem) foi observada para 21 dos 144 SNPs testados. Em contraste, apenas 5 SNPs alcançaram significância nominal para o fenótipo memória de trabalho, não alcançando portanto, significância estatística após a correção para múltiplos testes, e, mais importante, apenas um SNP alcançou significância ( $p = 0,04$ ) para associação com a capacidade de leitura e escrita. Estes resultados fornecem um forte apoio ao *ROBO1* como um gene envolvido em uma característica central subjacente à aquisição da linguagem, porém, não apoiam o envolvimento desse gene com os mecanismos subjacentes à habilidade de leitura.

Pesquisas com *Drosophila* sp indicaram que a função do gene *ROBO1* está relacionada com a orientação dos axônios e dendritos (Kidd et al., 1998). O *ROBO1* está envolvido com a simetria bilateral do sistema nervoso, devido à sua influência sobre os axônios que se projetam através da linha média durante a migração, guiados por gradientes químicos de longa distância. Sendo membro de uma família de genes com funções similares, *ROBO1* tem um papel na orientação de axônios e também atua como precursor na orientação de neurônios (Andrews et al., 2006).

### **KIAA0319L**

Localizado no locus *DYX8* (1p34.3), o gene *KIAA0319-like* (*KIAA0319L*) tem uma alta identidade ao gene *KIAA0319* quanto à sequência de proteína. O *KIAA0319L* é um alvo natural para estudos de associação devido à sua proximidade ao locus *DYX8* e homologia com *KIAA0319*. No entanto, apenas um único estudo relatou associação do gene *KIAA0319L* em uma amostra de famílias canadenses (Couto et al., 2008). Dos vários SNPs testados, uma associação modesta com a dislexia foi observada para apenas um deles, o rs7523017 (Couto et al., 2008).

Poon et al. (2010) apresentaram elementos adicionais que apoiaram o *KIAA0319L* como um candidato para este distúrbio. Esse estudo utilizou um ensaio de imunohistoquímica no córtex humano, para mostrar a co-localização de *Kiaa0319-like* e seu parceiro de interação específico nas células. Observou-se que o Receptor Nogo 1 (NgR1), um receptor de orientação do axônio, apresentava interações físicas com a proteína *Kiaa0319-like*, e que essas duas proteínas interagem predominantemente nos grânulos citoplasmáticos dos neurônios corticais no cérebro humano

(Poon et al., 2010). Isso deu suporte à ideia de que a proteína Kiaa0319-like participaria na orientação dos axônios neuronais.

### ***MPL19 e C2ORF3***

Kaminen et al. (2003) refinaram a localização do locus *DYX3* à região 2p11 através de mapeamento por desequilíbrio de ligação (LD) de uma região de 157 kb em um conjunto de famílias finlandesas usando um fenótipo categórico de dislexia. Análises de ligação paramétricas e não paramétricas refinaram essa região candidata usando marcadores microsatélites (Peyrard-Janvid et al., 2004). Anthoni et al. (2007) mostraram suporte para dois genes, *MRPL19* (Proteína mitocondrial e ribossomal 19) e *C2ORF3* (Cromossomo 2 *open reading frame* 3), como candidatos para essa região.

Anthoni et al. (2007) observaram associação para a região 2p11, nas famílias finlandesas estudadas previamente por Kaminen et al. (2003), e também em um conjunto adicional de 251 famílias alemãs. Dois haplótipos de risco sobrepostos, abrangendo 16 kb, foram identificados em ambos os conjuntos de amostras em separado, bem como em análise conjunta (Anthoni et al., 2007). Os haplótipos de risco foram localizados em uma região intergênica entre *FLJ13391* e *MRPL19 / C2ORF3*.

*MRPL19* e *C2ORF3* estão em forte desequilíbrio de ligação LD e são co-expressos em altas taxas em vários tecidos provenientes de regiões de cérebro de humanos adultos (Anthoni et al., 2007). A expressão de *MRPL19* e *C2ORF3*, mas não de *FLJ13391*, também foi correlacionada com a dos genes candidatos *DYX1C1*, *ROBO1*, *DCDC2* e *KIAA0319*. Apesar de algumas alterações terem sido identificadas nesses genes, nenhuma delas foi associada significativamente com dislexia. Entretanto, os portadores heterozigotos do haplótipo de risco mostraram expressão significativamente atenuada de ambos os genes (*MRPL19* e *C2ORF3*), em comparação com os não-portadores. Além disso, análises de ortólogos do gene *C2ORF3* em quatro primatas não-humanos sugerem diferentes taxas evolutivas para os primatas, em relação a outros grupos (Anthoni et al., 2007).

### **Novos Genes Identificados**

Dois estudos recentes propuseram outros genes como possíveis candidatos à dislexia. Um dos estudos confirmou ligação do cromossomo 18 e verificou associação em 3 genes, *MC5R*, *DYM*, *NEDD4L* (Scerri et al., 2010). No segundo estudo, quatro genes foram identificados no



cromossomo 21, *PCNT*, *DIP2A*, *S100B* e *PRMT2* (Poelmans et al., 2009). Porém, nenhum desses genes foram avaliados por estudos subsequentes.

Scerri et al. (2010) analisaram 264 famílias do Reino Unido e 155 famílias dos Estados Unidos, cada uma contendo pelo menos uma criança diagnosticada com dislexia. As famílias foram genotipadas com um denso conjunto de marcadores microssatélites no cromossomo 18. A análise de ligação revelou um amplo sinal, que alcançava aproximadamente 40 Mb (18p11.2 até 18q12.2). Um estudo de associação subsequente realizado pelos mesmos autores, mostrou associação consistente de um único SNP com três genes: *MC5R*, *DYM*, *NEDD4L*.

Poelmans et al. (2009) relataram a identificação de quatro genes novos candidatos à dislexia na região cromossômica 21q22.3: *PCNT*, *DIP2A*, *S100B* e *PRMT2*, através da técnica de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) e análise de microarranjos de uma deleção muito pequena na região, que co-segregava com a dislexia em um pai e seus três filhos.

#### 1.4.1.2 Análises Genes X Cérebro

O papel dos genes *DYX1C1*, *KIAA0319* e *DCDC2* no desenvolvimento cerebral têm sido desvendado através de estudos com RNA de interferência (RNAi) no útero de roedores, os resultados apontam para o envolvimento desses genes na migração neuronal (Meng et al., 2005; Paracchini et al., 2006; Rosen et al., 2007). Pesquisas com *Drosophila* sp, entretanto, indicaram que a função do gene *ROBO1* está relacionada com a orientação dos axônios e dendritos dos neurônios (Kidd et al., 1998). Segundo McGrath et al. (2006), há pelo menos uma correspondência aproximada entre as funções dos genes e os resultados de imagens cerebrais.

Os estudos de RNAi mostraram que logo após a transfecção, os neurônios que expressaram a construção de interferência ficaram presos na zona intermediária do cérebro, e muitos deles migraram durante a vida adulta do animal, embora atrasados, obtendo colocação laminar anormal. Além disso, alguns neurônios migraram através de brechas na lâmina basal produzindo ectopias, semelhante às imagens vistas nas autópsias de cérebros de disléxicos por Galaburda et al. (1985) (LoTurco et al., 2006; Wang et al., 2006). Ainda, as funções de migração neural e/ou axonal destes genes são consistentes com estudos de neuroimagem que têm mostrado um rompimento nas redes de leitura no hemisfério esquerdo de disléxicos (Demonet et al., 2004; Eckert, 2004).

Threlkeld et al. (2007) também descobriram que o RNAi para *Dyx1c1* no útero de ratas resulta em malformações heterogêneas que correspondem a diferentes deficiências comportamentais no processamento auditivo e aprendizagem espacial.

Estas observações sugerem que uma perturbação no desenvolvimento global do cérebro tem um papel na dislexia (Galaburda et al., 2006; McGrath et al., 2006). O fato de que as funções destes genes correspondem a estudos de imagem anterior, fornece uma razão para um otimismo cauteloso de que os níveis de análise genes/cérebro pode alcançar a convergência.

#### 1.4.1.3 Desequilíbrio de Ligação e Estudos de Associação

Os estudos de associação se baseiam nas diferenças das frequências de variantes alélicas polimórficas entre indivíduos afetados em comparação com controles não afetados na população. Os desenhos experimentais para a condução de estudos de associação são atualmente quase todos baseados no princípio de desequilíbrio de ligação, tanto em desenhos com regiões candidatas ou por varredura genômica (GWAS, do inglês *Genome-wide association studies*).

O desequilíbrio de ligação pode ser entendido como um desvio na frequência da ocorrência conjunta de alelos em dois ou mais locos adjacentes (haplótipos) em relação à frequência esperada em uma segregação independente (Lewontin, 1988; Strachan e Read, 2002). O DL é uma medida estatística que pode estimar os valores de associação entre alelos e estes são calculados de acordo com métodos estatísticos específicos. A quantificação do desequilíbrio de ligação pode ser realizada de diversas maneiras. A mensuração do DL pode então ser realizada usando grau de associação entre pares de marcadores bialélicos definidos comumente de  $D'$  (calcula o desequilíbrio gamético) e  $r^2$  (normalizado em função de suas frequências alélicas) (Lewontin, 1988).

A demonstração de que o genoma humano é dividido em locos de alto e baixo desequilíbrio de ligação levou a racionalização de que o número de SNPs necessários para o desenvolvimento de estudos de associação por varredura do genoma total poderia ser menor que os 1 milhão previstos caso o desequilíbrio de ligação fosse homogêneo ao longo o genoma com extensão máxima de 3000 pares de base (Zhang et al., 2002).

Com o objetivo de oferecer maior racionalidade na escolha de SNPs que permitissem capturar a maior diversidade haplotípica ao longo do genoma, foi iniciado o projeto HapMap (*The International HapMap Consortium*, 2003). Os tagSNPs são os SNPs que apresentam alta capacidade

de capturar a diversidade de variabilidade de haplotípica ao longo de todo o genoma, o que possibilita a utilização de um menor número de SNPs no estudo, capturando toda a variabilidade haplotípica. O projeto HapMap vem sendo utilizado como referência para escolha de tagSNPs uma vez que este identifica padrões comuns na sequência de DNA e a correlação entre estes (Tantoso et al., 2006) .

Na maioria dos estudos atuais, as investigações de genes candidatos para doenças complexas, como a dislexia, têm sido realizados utilizando SNPs em estudos tipo caso-controle e estudo de famílias. No desenho de caso-controle as probabilidades de ocorrência de certos genótipos ou alelos são comparadas entre um grupo de indivíduos afetados (casos) e não afetados (controles) dentro da amostra. Os estudos de associação do tipo caso-controle têm a vantagem de ser relativamente mais simples quanto a amostragem, mas a principal desvantagem é que, se houver estratificação populacional, ou seja, a persistência de heterogeneidades entre o grupo caso e o grupo controle, os resultados dessa associação podem ser espúrios. Já os estudos em famílias evitam possíveis problemas associados com a estratificação populacional.

**II. JUSTIFICATIVA**

---

A dislexia é um dos distúrbios de aprendizagem mais frequentes, que compromete principalmente a aquisição e o desenvolvimento das habilidades de leitura. Acredita-se que essas dificuldades são decorrentes de deficiências no processamento da informação fonológica, devido a um funcionamento anormal do cérebro. As crianças com dislexia vivenciam uma série de dificuldades escolares, que podem desencadear a frustração, o desinteresse, e até mesmo a depressão. Nesse sentido, o diagnóstico e a intervenção precoce são fortemente recomendados.

O diagnóstico da dislexia é feito em crianças com idade escolar, encaminhadas por pais ou professores, com base em vários testes aplicados por uma equipe interdisciplinar especializada. Quanto mais cedo a criança é encaminhada para o diagnóstico e a intervenção, menos o aprendizado da criança é prejudicado. Ainda não existe um único protocolo para o diagnóstico da dislexia na população mundial em geral. É necessário, portanto, buscar estratégias que facilitem a identificação desse distúrbio precocemente, sendo a genética uma abordagem promissora.

A dislexia é uma condição complexa e multifatorial. Desse modo, muitas pesquisas sugerem a existência de vários genes atuando na determinação do fenótipo. Várias regiões cromossômicas já foram localizados no genoma através de estudos de ligação em grandes famílias afetadas com a dislexia. E em alguns desses *loci*, genes candidatos foram identificados através de estudos de associação e desequilíbrio de ligação. Apesar dessas interessantes descobertas, nenhuma mutação funcional nesses genes foi efetivamente relacionada com a causa do distúrbio até o momento. A inconsistência de muitos estudos de genes candidatos, aponta para a importância da replicação desses achados em diferentes populações.

Durante o levantamento bibliográfico, foi constatada a escassez de estudos científicos no Brasil sobre o assunto. Ainda não há nenhum trabalho publicado a respeito da prevalência do distúrbio na nossa população, e considerando a genética da dislexia, nenhum trabalho brasileiro foi encontrado.

Nesse sentido, este trabalho visa estudar os genes candidatos já descritos em indivíduos brasileiros. Trata-se de um assunto emergente que poderá fornecer importantes informações para o entendimento da dislexia e para futuros protocolos de diagnósticos e de conduta para os indivíduos afetados.

### **III. OBJETIVOS**

---

## 1. Gerais

Estudar genes propostos como candidatos à dislexia, através da detecção de deleções e duplicações no DNA e pela realização de estudo de associação, com o intuito de verificar se há relação entre os achados moleculares e a manifestação do distúrbio em escolares brasileiros.

## 2. Específicos

- Rastrear deleções e duplicações nos genes candidatos: *KIA00319*, *DCDC2* e *ROBO1*, e também nos genes *KAAG1* e *NRSN1* e *ROBO2*, utilizando a técnica de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)*, em amostras de crianças e adolescentes com diagnóstico de dislexia.
- Determinar o genótipo dos indivíduos para 4 SNPs (*Single-nucleotide polymorphisms*) do gene *DYX1C1*, previamente descritos na literatura.
- Determinar as frequências dos haplótipos na população estudada e investigar associações com o diagnóstico da doença, usando o Teste de Transmissão de Desequilíbrio de Ligação (TDT).

## IV. CASUÍSTICA

---



A avaliação interdisciplinar do grupo de estudo foi conduzida no Laboratório de Pesquisa em Dificuldades, Distúrbios de Aprendizagem e Transtornos da Atenção (DISAPRE) localizado no Hospital das Clínicas (UNICAMP), e na Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e Linguagem (ATEAL) localizado em Jundiaí, SP. Os laboratórios recebem encaminhamentos de crianças e jovens com queixas de dificuldades de aprendizagem para avaliação multidisciplinar (neuropsicologia, fonoaudiologia e outros profissionais) e diagnóstico.

O estudo foi composto, ao todo, por 49 famílias de crianças e adolescentes, na faixa etária de 7 a 17 anos, sendo divididas em dois grupos devido às diferenças na avaliação clínica. O grupo I foi composto por 24 famílias que foram encaminhadas pelo DISAPRE/UNICAMP, e o grupo II foi composto por 25 famílias que foram encaminhadas pela ATEAL.

O grupo I foi composto em grande maioria por trios (pai, mãe e filho). Na Tabela 1 estão representadas as 24 famílias desse grupo. Observa-se que as famílias 3 e 4 possuem mais de um filho afetado. E nas famílias 8, 12 e 20 não foi possível realizar a coleta de um dos pais.

Tabela 1 - Composição de famílias do grupo I.

<b>Família</b>	<b>Nº de indivíduos participantes</b>	<b>Nº de afetados diagnosticados</b>	<b>Sexo do(s) indivíduo(s) afetado(s)</b>	<b>Ambos os pais genotipados?</b>
1	3	1	M	Sim
2	3	1	F	Sim
3	4	2	M/M	Sim
4	5	3	M/M/M	Sim
5	3	1	M	Sim
6	3	1	M	Sim
7	3	1	M	Sim
8	2	1	M	Não
9	3	1	M	Sim
10	3	1	F	Sim
11	3	1	F	Sim
12	2	1	M	Não
13	3	1	M	Sim
14	3	1	M	Sim
15	3	1	M	Sim
16	3	1	M	Sim
17	3	1	M	Sim
18	3	1	M	Sim
19	3	1	F	Sim
20	2	1	M	Não
21	3	1	M	Sim
22	3	1	F	Sim
23	3	1	M	Sim
24	4	1	F	Sim

O grupo II foi composto por 18 trios (pai, mãe e filho) e mais 7 famílias incompletas, em que ou o pai ou a mãe não fizeram parte do estudo. Além disso, ainda foram encaminhados 11 irmãos não afetados, de indivíduos diagnosticados como disléxicos, pertencentes a essas famílias (ver Tabela 2).

Tabela 2 - Composição de famílias do grupo II.

<b>Família n</b>	<b>Nº de indivíduos participantes</b>	<b>Nº de afetados diagnosticados</b>	<b>Sexo do(s) indivíduo(s) afetado(s)</b>	<b>Ambos os pais genotipados?</b>
1	4	1	F	Sim
2	3	1	M	Não
3	3	1	M	Sim
4	3	1	F	Sim
5	4	1	M	Sim
6	2	1	F	Não
7	3	1	M	Não
8	2	1	M	Não
9	3	1	F	Sim
10	4	1	M	Sim
11	2	1	M	Não
12	3	1	M	Sim
13	3	1	M	Sim
14	4	1	M	Sim
15	2	1	M	Não
16	3	1	M	Sim
17	2	1	M	Não
18	3	1	M	Sim
19	4	1	M	Sim
20	3	1	F	Sim
21	4	1	M	Sim
22	4	1	M	Sim
23	4	1	M	Sim
24	3	1	M	Sim
25	3	1	M	Sim

### 1. Avaliação clínica

Os pacientes foram avaliadas de maneira individual em salas do Laboratório DISAPRE e na ATEAL por profissionais especializados da fonoaudiologia e neuropsicologia. Devido a diferenças na avaliação clínica e diagnóstico das duas instituições, os instrumentos utilizados serão citados separadamente. Para ambos os grupos, os critérios de inclusão e exclusão utilizados foram:

#### **Critérios de inclusão:**

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais ou responsáveis;

- Crianças com acuidade visual e auditiva e desempenho cognitivo dentro dos padrões da normalidade;
- Crianças com queixas em leitura e escrita;
- Não fazer uso de medicamento psicotrópico;
- Não apresentar outro quadro neurológico.

**Critérios de exclusão:**

- Criança com diagnóstico de Distúrbio de Aprendizagem não específico;
- Crianças com baixa acuidade visual e auditiva e desempenho cognitivo abaixo dos padrões da normalidade;
- Síndromes genéticas ou outras síndromes.

### **1.1 Avaliação clínica dos pacientes do grupo I**

#### Avaliação Fonoaudiológica

- Roteiro de Anamnese para os pais: entrevista específica com os pais referente a relação desenvolvimento/aprendizagem dos escolares participantes deste estudo;
- Avaliação Fonológica da Criança (AFC): o instrumento tem por objetivo elicitare a amostra representativa da fala da criança por meio da nomeação espontânea (Yavas; Hernandorena; Lamprecht, 1992).
- Aplicação da Prova de Consciência Fonológica – Instrumento de Avaliação Sequencial (CONFIAS) desenvolvida por Moojen et al. (2003). Esta prova é composta de duas partes, sendo a primeira correspondente à consciência silábica. A segunda parte corresponde à consciência de fonemas.
- Teste de Nomeação Automática Rápida (Denckla e Rudel, 1974, Ferreira, et al., 2003), composta dos sub-testes de nomeação de cores, dígitos, letras e objetos.
- Prova de Leitura e Escrita: O procedimento consiste na leitura oral e escrita sob ditado (Pinheiro, 1994). As listas que são apresentadas aos sujeitos estão organizadas com base na correspondência fonema-grafema da ortografia da língua portuguesa.
- Escrita temática: O procedimento é utilizado pelos critérios de Abaurre (1987) no qual é solicitado um tema à criança para a elaboração.
- Prova de repetição de palavras sem significado (Kessler, 1997): é aplicada uma lista de 30

palavras sem significado para o português.

#### Avaliação Neuropsicológica

- Entrevista Estruturada de Anamnese: modelo simplificado de anamnese com os pais para a coleta de dados referentes ao desenvolvimento da criança;
- *Child Behavior Checklist* (CBCL) (Inventário de Comportamentos da Infância e Adolescência; Bordin, Mari e Caeiro, 1995): tem como objetivo avaliar as características emocionais e comportamentais de crianças e jovens de 4 a 18 anos de idade. Trata-se de um questionário para os pais composto por 138 itens divididos em dois blocos.
- Escala de Inteligência Wechsler para Crianças (WISC-III) (Figueiredo, 2002): foi adaptada e padronizada para a população brasileira como instrumento clínico.
- Testes de Cancelamento (TC) (Guerreiro, 1993; Weintraub e Mesulam, 1985): constitui um teste de performance contínua que requer rápida seletividade visual e resposta motora repetitiva, e tem como objetivo avaliar a atenção sustentada visuo-espacial.
- *Trail Making Test* (TMT) - Teste das Trilhas (Spreeen e Strauss, 1998): o material e instruções do TMT foram adaptados a partir das orientações presentes em Spreeen e Strauss (1998). A parte A do TMT é um teste de atenção sustentada visual, e a Parte B é considerada um teste de flexibilidade mental.
- *Stroop Color Word Test* (SCWT) (Spreeen e Strauss, 1998): avalia a capacidade de o indivíduo selecionar estímulos relevantes e ignorar os estímulos irrelevantes.
- *Tower of London* (TOL) - Torre de Londres (Tunstall, 1999): avalia a habilidade de planejamento mental.
- *Wisconsin Card Sorting Test* (WCST) - Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (Cunha et al., 2005): padronizado para a população brasileira, constitui um instrumento para avaliar as funções executivas e requer planejamento estratégico e exploração organizada, direcionando o comportamento para alcançar um objetivo e modulando a responsividade impulsiva.

#### 1.2 Avaliação clínica dos pacientes do grupo II

- Roteiro de Anamnese para os pais: entrevista específica com os pais referente a relação desenvolvimento/aprendizagem dos escolares participantes deste estudo;

- Escala Wechsler de inteligência para crianças (WISC-III): cujo objetivo básico foi medir quantitativamente o nível cognitivo geral, através de operações mentais como associações, deduções, tipo de raciocínio, entre outras;
- Teste de desempenho escolar (TDE) (Stein, 1994.): os sujeitos foram submetidos à avaliação das capacidades fundamentais para o desempenho escolar, especificamente, escrita, aritmética e leitura;
- Prova de nomeação automática rápida (RAN) (Denckla e Rudel, 1974); composta dos subtestes de nomeação de cores, dígitos, letras e objetos.
- Prova de consciência fonológica (PCF) (Capovilla e Capovilla, 1998): composta de dez subtestes, com quatro itens cada, que se referem à verificação da habilidade de síntese, segmentação, manipulação e transposição silábica e fonêmica, rima e aliteração. O resultado da prova é apresentado em forma de escore total. Os resultados foram analisados estatisticamente, sendo adotado o nível de significância de 5%.

## V. MÉTODOS

---

Após a confirmação diagnóstica e estabelecido o perfil clínico, as crianças que preencheram os critérios de inclusão foram encaminhadas para avaliação genética no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)/UNICAMP. O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp sob o parecer N° 105/2008 e foi composto dos seguintes procedimentos:

### **1. Extração de DNA genômico de sangue periférico**

A extração do DNA genômico foi feita a partir de leucócitos obtidos em 8 a 15 mL de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o método fenol/clorofórmio. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas usando *Spectrophotometer NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000* (NanoDrop Technologies Inc., Detroit, USA).

### **2. Técnica de MLPA**

A técnica denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método sensível, econômico e rápido, que visa à quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de várias sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes (Schouten et al., 2002, Sorensen et al., 2008).

A técnica é constituída por quatro fases: Desnaturação, Hibridização, Ligação e Amplificação. Nas duas primeiras, o DNA genômico é desnaturado a uma determinada temperatura, e então hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica para a região a ser estudada). Cada sonda é formada por dois oligonucleotídeos, representados na Figura 8, constituídos da seguinte maneira:

- Oligonucleotídeo Y: contém um marcador fluorescente, seguido de uma sequência homóloga ao primer universal Y, além da sequência de hibridização homóloga ao DNA-alvo.
- Oligonucleotídeo X: contém uma sequência homóloga ao *primer* universal X, seguido de uma sequência-coringa (com extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais) e uma sequência de hibridização homóloga ao DNA-alvo.

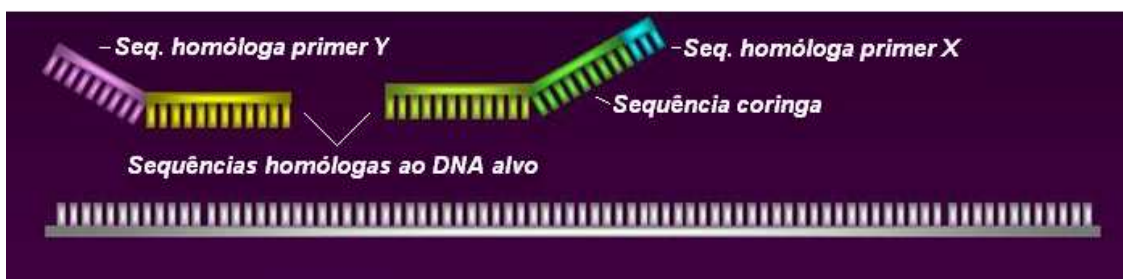


Figura 8 - Constituição dos oligonucleotídeos das sondas de MLPA. (Adaptado de MRC-Holland 2010, disponível no site:< [http:// www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)>. Acesso em dez/2010 ).

Esses oligonucleotídeos, quando submetidos à temperatura de anelamento, hibridizam-se a sequências complementares ao DNA-alvo e, a seguir, em temperatura ambiente, são unidos por uma enzima ligase dependente de temperatura (Fase de Ligação), formando um fragmento único.

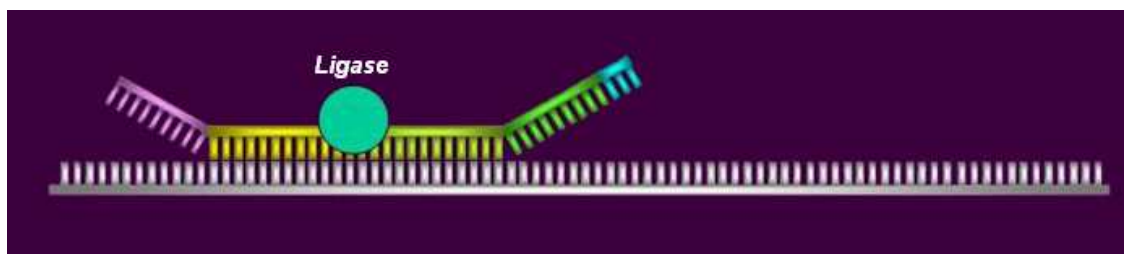


Figura 9 - Fragmento único resultado da reação de ligação.

Após a ligação, inicia-se a fase de amplificação, na qual os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, utilizando-se *primers* universais que se anelam às sequências não-homólogas situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação (Schouten et al., 2002).

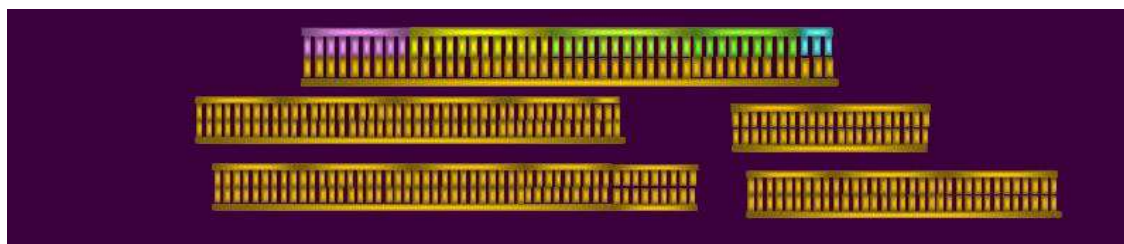


Figura 10 - Resultado da amplificação dos produtos de ligação através de PCR, com a utilização de *primers* universais.



Em seguida, tais produtos são separados em aparelho de eletroforese capilar e podem ser analisados em relação aos controles sem alteração, a partir de programa específico de genotipagem. Dados de área ou altura de pico de cada produto de amplificação podem ser utilizados na normalização, e refletem o número relativo de cópias de cada sequência-alvo, permitindo, por exemplo, que o número de cópias localizadas nas extremidades cromossômicas que sofreram deleção ou duplicação seja identificado (Schouten et al., 2002).

## **2.1 Procedimentos para a técnica de MLPA**

### **2.1.1 Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas**

O DNA genômico foi diluído com Tris EDTA 1X para que atingisse a concentração final de 250 ng em 5  $\mu$ L. Os DNAs diluídos foram aquecidos a 98°C e resfriados a 25°C, em seguida foi adicionada a mistura de 1,5  $\mu$ L de *SALSA Probe-mix* (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda) e 1,5  $\mu$ L de *MLPA buffer* (MRC-Holland) em cada tubo. Em seguida as amostras foram misturadas cuidadosamente e incubadas a 95°C por 1 minuto e posteriormente por 16 horas a 60°C em termociclador.

### **2.1.2 Reação de Ligação**

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32  $\mu$ L de Mix Ligase-65 foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão da mistura. Em seguida, as amostras permaneceram incubadas a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

### **2.1.3 Reações da PCR Multiplex**

Foram adicionados 4  $\mu$ L 10X *SALSA PCR buffer* (MRC-Holland), 26  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ L da reação de ligação de *MLPA* a novos tubos (para cada amostra), que ficaram mantidos em termociclador a 60°C. Em seguida, 10  $\mu$ L de *Mix Polymerase* (MRC-Holland) foram acrescentados a cada tubo, para assim iniciar a reação de PCR, segundo o protocolo de 30 segundos-95°C; 30 segundos-60°C; 60 segundos-72°C, por 35 ciclos. Por fim, as amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos.

### 2.1.4 Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar

Posteriormente à reação de PCR foram misturados às amostras 0,75 µL da reação de PCR, 0,75 µL de água, 0,5 µL de 500 ROX, 13,5 µL (Applied Biosystem-Applera Corporation, EUA) Formamida Hi-Di (Applied Biosystems), em seguida, desnaturados a 95°C por 5 minutos e resfriados em gelo. A leitura foi realizada no equipamento de eletroforese capilar ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados utilizando o Software GeneScan (Applied Biosystems).

### 2.1.5 Análise dos dados obtidos por MLPA

O software Genotyper (Applied Biosystem) foi utilizado para a análise de várias amostras. Esse software reconhece e identifica cada sonda no eletroferograma e mostra a área dos picos de cada uma. Deleções em heterozigose da sequência de reconhecimento da sonda mostram, no eletroferograma, uma redução de 35-50% da área relativa do pico referente ao produto de amplificação daquela sonda.

A área dos picos dos amplicons representando a respectiva sonda, foram exportados para planilhas do programa Microsoft Excel® e os cálculos foram realizados de acordo com o método descrito por Taylor et al. (2003), dados foram normalizados dividindo-se a área do pico de cada sonda pela soma das áreas dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela média das áreas dos picos correspondentes dos indivíduos controles. Quando da presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores dos dados normalizados teoricamente serão de 0,5 e 1,5, respectivamente, se considerado 1,0 como valor normal.

## 2.2 O Kit de MLPA

O Kit usado neste estudo foi o SALSA MLPA P150 (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda) ele contém sondas para a maioria dos exons do gene *DCDC2*, e também para alguns exons dos genes candidatos *KIAA0319* e *ROBO1*. Além disso, há várias sondas para os genes *KAAG1* e *NRSNI (VMP)* (que estão localizados próximos ao gene *DCDC2*), bem como sondas para o gene *ROBO2* (próximo ao gene *ROBO1*) no cromossomo 3p12. O kit contém 40 sondas com produtos de amplificação entre 130 e 436 nucleotídeos, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Sondas do Kit SALSA P150. Adaptado do protocolo do fabricante.

Nº	Gene	Exon/Cromossomo	Tamanho (nt)	Seq. Parcial (20 nt adjacentes ao sítio de ligação)
1	<i>DCDC2</i>	Exon 1	364	GTGACATAAT-TTCCTGCACA rev
2	<i>DCDC2</i>	Exon 1	190	AGAAGAAGGT-GTCCAGCTTC
3	<i>DCDC2</i>	Exon 2	166	GATTTCTCCT-ATGTCCAAGT rev
4	<i>DCDC2</i>	Exon 3	196	CAACGTGTCA-GCTCGCTTTA
5	<i>DCDC2</i>	Exon 4	220	GTGGGATCAT-GTACTACAAA
6	<i>DCDC2</i>	Exon 5	265	AGAGTTGGAG-AATGGGCAGT
7	<i>DCDC2</i>	Exon 6	310	TACTCTCCCT-TTAGACTTTC rev
8	<i>DCDC2</i>	Exon 7	355	TAGGGAAATG-ATCGCCACTC
9	<i>DCDC2</i>	Exon 8	399	AGAGAGGTCT-GAAACACGGG
10	<i>DCDC2</i>	Exon 9	148	AGGCACCGAT-GAGGAGAATG
11	<i>DCDC2</i>	Exon 10	154	TTATTTAATA-TTCTATATG rev
12	<i>KIAA0319</i>	Exon 1	178	GGAGGAACAA-GTGGGACGGC
13	<i>KIAA0319</i>	Exon 2	247	CTTCATTGCT-GCTGCTGGTG
14	<i>KIAA0319</i>	Exon 21	427	AGCACGAGAT-GGAATGACCA
15	<i>KAAG1</i>	Exon 1	238	CTTCATATCA-ACCCACACT
16	<i>KAAG1</i>	Exon 1	328	AGCACGCTCT-TCACGACGGG
17	<i>NRSNI</i>	Exon 1	208	CAGCTAGGCT-GGCTGCACTT
18	<i>NRSNI</i>	Exon 3	370	TGAGGACTGT-ACAGCCTCAA
19	<i>NRSNI</i>	Exon 4	136	GCTGGCAGGA-GCTGTTCTCT
20	<i>ROBO1</i>	Intron 2-3	172	TAGGTTTCCT-TTGTGTGTTA rev
21	<i>ROBO1</i>	Exon 3	202	TACTGTTACT-ACTGTGACCC
22	<i>ROBO1</i>	Exon 3	232	TGATAACGAT-GACAATTCGC
23	<i>ROBO1</i>	Exon 4	274	ACCTCGCATT-GTTGAACACC
24	<i>ROBO1</i>	Exon 4	319	GAAGGAGTCT-ATGTCTGTGT
25	<i>ROBO1</i>	Exon 5	418	GCCCACCATT-TCATGGAAGA
26	<i>ROBO1</i>	Exon 6	409	CATGATCACT-TACACCCGTA
27	<i>ROBO1</i>	Exon 9	292	GGGACGGACT-GTAACTTTTC
28	<i>ROBO1</i>	Exon 17	214	TTAGTTGGCA-GCCACCTCCA
29	<i>ROBO1</i>	Exon 26	184	TCAGTCCACT-GCCACTCTGA
30	<i>ROBO1</i>	Exon 31	382	GCAAACCATT-ATACCTTACT
31	<i>ROBO2</i>	Exon 3	283	AAGCTACGTT-TGTGTTGCGA
32	<i>ROBO2</i>	Exon 4	338	CCTTGTCATC-AATTCGAACT rev
33	<i>ROBO2</i>	Exon 23	142	AAGCTACGTT-TGTGTTGCGA
34	Ref. probe	5q31	130	TACATTGTCACTGCAAATCGACACCTA
35	Ref. probe	15q21	160	GCCGAGTACAAAATTCCTTGTCTGGA
36	Ref. probe	17q21	226	ACTGGCCAACAATTGCTTGACTGTTCTTTACCA
37	Ref. probe	16q22	301	CAAAGACAAAGAAGGCAAGGTTTTCTACA
38	Ref. probe	17q11	346	GAGCTTTACTTACAGTGTCTGAAGAAGTTCGAA
39	Ref. probe	13q14	391	CGGTCTTCATGCAGAGACTGAAAACAAAT
40	Ref. probe	1p36	436	GTCTCCGCGCCGAGAACGAGAAGAAG

### 3. Estudo do gene candidato *DYX1C1*

A análise de associação do gene *DYX1C1* foi realizada baseada em famílias, o que propiciou redução de problemas como estratificação da população e o pareamento inadequado de casos e controles (Evangelou, 2006).

No desenho desse estudo, a escolha do gene *DYX1C1* foi motivada por achados prévios na literatura que mostraram associação de algumas variantes à dislexia em mais de um estudo, e pela descoberta da implicação desse gene no desenvolvimento cerebral (com atuação na migração neuronal). E também porque, apesar da sua relevância, esse gene não está incluso no de kit MLPA P150.

### 3.1 A seleção dos polimorfismos a serem estudados

Inicialmente, a seleção de SNPs para o gene *DYX1C1* foi realizada utilizando-se a ferramenta SNPTagger do programa Haploview 4.1 (Disponibilizado em: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) a partir do banco de dados das populações estudadas pelo projeto HapMap. Foi usada como painel de análise a população residente de Utah, Estados Unidos, com ancestralidade européia (CEU), indivíduos de etnia Yoruba de Idaban, Nigéria (YRI), e Chineses Han, de Pequim e Japoneses de Tóquio (CHB+JPT). Os parâmetros utilizados na seleção foram: frequência alélica mínima (MAF) > 0,05; valor de  $p < 0,01$  para desequilíbrio de Hardy-Weinberg; e grau de desequilíbrio de ligação ( $D'$  e  $r^2$ ) < 0.8.

O programa *TDT POWER CALCULATOR* foi utilizado para verificação do poder estatístico da amostra (Chen and Deng, 2001), para isso utilizou-se um nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e uma prevalência = 5%. Devido ao pequeno número amostral de famílias participantes, foram selecionados 4 SNPs, citados na Tabela 4, para que fosse obtido um poder estatístico superior a 80%. A decisão pelos marcadores para a genotipagem foi baseada em achados prévios na literatura, que mostraram associação ou possível papel funcional de haplótipos de risco dos quatro SNPs selecionados (rs57809907, rs17819126, rs3743205 e rs16787) com a dislexia, conforme já descrito na introdução.

Tabela 4 - SNPs selecionados no gene *DYX1C1* e sua posição no cromossomo 15.

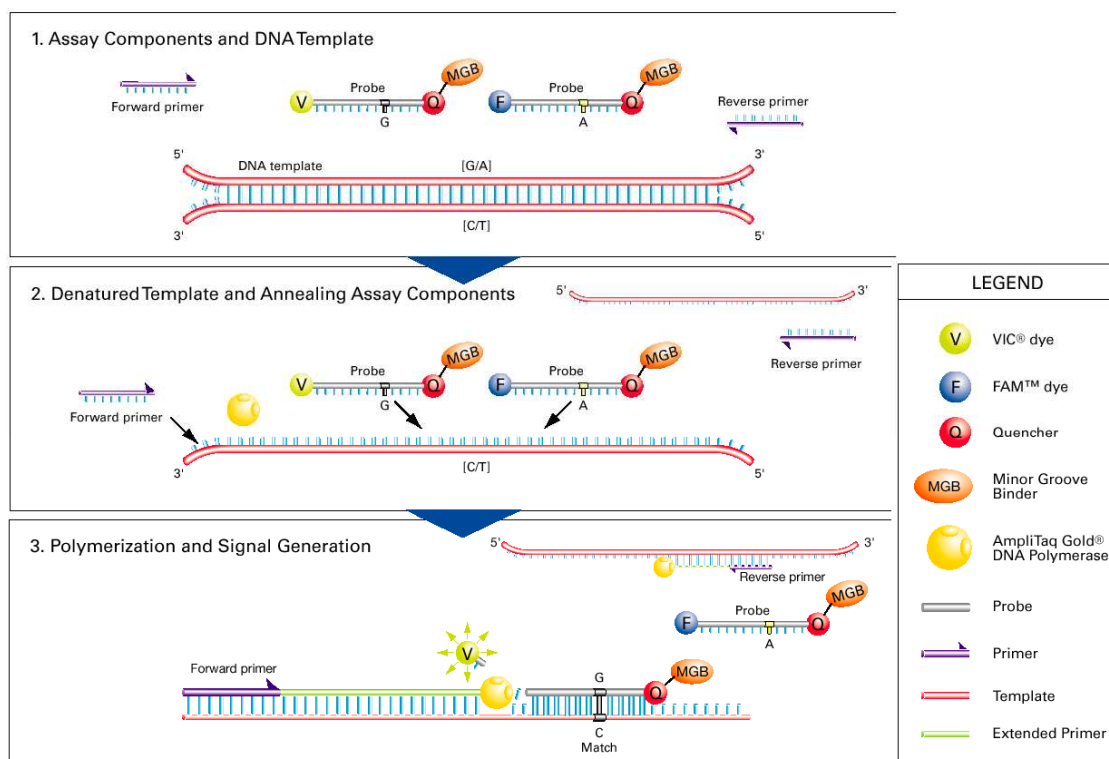
Gene	Lócus	SNP	Posição
<i>DYX1C1</i>	<i>DYX1</i>	rs16787	55800837
		rs3743205	55790530
		rs17819126	55789910
		rs57809907	55722882

### 3.2 Genotipagem dos alelos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

O ensaio de discriminação alélica Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado para a genotipagem dos alelos dos quatro SNPs selecionados. Esse ensaio determina se a amostra desconhecida é um homozigoto normal (apresenta apenas o alelo 1), homozigoto afetado (possuem apenas o alelo 2) ou heterozigoto (possuem tanto o alelo 1 quanto o alelo 2).

Dois sondas fluorogênicas permitem a detecção de produtos específicos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) à medida em que estes são produzidos, o esquema da reação está representado na Figura 11. As sondas de oligonucleotídeos contêm um pigmento fluorescente na extremidade 5', que é o responsável por diferenciar o alelo detectado (VIC<sup>®</sup> no alelo 1 e FAM<sup>™</sup> no alelo 2), um pigmento *quencher* (que capta a fluorescência emitida pelos outros pigmentos fluorescentes) no final 3', ligado a um *minor groove-binder* (MGB). O MGB permite o aumento da temperatura de desnaturação durante a PCR sem aumento no tamanho da sonda, permitindo o desenho de sondas mais curtas; este tipo de sonda permite uma diferença maior na temperatura de desnaturação entre sondas e conseqüentemente, maior acurácia na discriminação alélica. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade do pigmento quencher reduz ao máximo a fluorescência emitida pelo pigmento por meio da transferência de energia ressonante fluorescente (FRET), através do espaço.

A sonda se anela na sequência alvo, sendo clivada pela atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase à medida em que o primer se estende. A clivagem da sonda separa o pigmento fluorescente do pigmento quencher, liberando o sinal fluorescente específico (FAM ou VIC) para captação por câmera CCD, durante a fase de extensão da PCR; simultaneamente ocorre a remoção da sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do primer continue até o final da fita alvo. Assim, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR. Moléculas adicionais do pigmento fluorescente são clivadas da respectiva sonda a cada ciclo, resultando no aumento da fluorescência proporcional à quantidade de amplicons produzidos. Assim, os possíveis resultados do ensaio de discriminação alélica são três: aumento substancial da fluorescência do pigmento VIC indica homozigosidade do alelo 1; aumento substancial da fluorescência do pigmento FAM indica homozigosidade do alelo 2; e aumento no sinal de fluorescência dos dois pigmentos indicam heterozigosidade.



### 5' Nuclease assay process

Figura 11 - Esquema da reação de PCR em Tempo Real para detecção alélica. (Disponível em: <[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_040027.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040027.pdf)>. Acesso em dez/ 2010).

### 3.2.1 Procedimentos para a reação de PCR em tempo real

O ensaio TaqMan® (Applied Biosystems) foi utilizado para detecção dos alelos. A mistura da reação foi preparada utilizando-se o método de adição de DNA úmido. Em placa ótica *MicroAmp* 96 poços (Applied Biosystems), a solução foi preparada contendo 2X *Taqman Universal PCR Master Mix* (3,5 µL), 20X *SNP Assay Mix* (0,175 µL), Água MiliQ (2,325 µL) e amostra de DNA genômico (1 µL). O volume final para cada poço foi de 7 µL.

O *Universal Master Mix* combina todos os componentes necessários para realizar o ensaio 5' nuclease com as sondas TaqMan® (Applied Biosystems), e contém 250 U de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, 100 U de AmpErase® UNG, dNTP, 10X *TaqMan® Buffer A*, 25mM de MgCl<sub>2</sub> em solução. O *SNP Assay Mix* contém um par de *primers* (sense e antisense), uma sonda marcada com pigmento VIC® e uma sonda marcada com pigmento FAM™. Os *primers* e as sondas foram desenhados conforme orientação do serviço SNP assay-by-design da Applied

Biosystems.

A reação de PCR foi realizada utilizando *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, California, EUA), de acordo com as seguintes temperaturas e duração dos ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, finalizando-se com uma extensão a 60°C por um minuto. O sinal de fluorescência foi detectado por *7500 System Sequence Detection Software*<sup>®</sup> (SDS):

Após a reação de amplificação, a análise pós-PCR foi realizada. O software SDS plota os resultados num histograma do alelo X versus alelo Y. Os pontos podem se localizar ao longo do eixo horizontal (sendo reconhecidos como alelo X), ao longo do eixo vertical (reconhecidos como alelo Y), ou ao longo da diagonal (sendo identificados como alelos X e Y, ou seja, heterozigotos).

### 3.2.2 Análise estatística dos dados

O estudo de associação baseado em famílias foi realizado utilizando o Teste de Transmissão de Desequilíbrio de Ligação (*Transmission Disequilibrium Test* - TDT). O TDT é uma adaptação de um estudo de caso-controle sendo os alelos presentes nos indivíduos afetados considerados os casos. Tomando-se os alelos encontrados nos progenitores, faz-se uma tabela de contingência (2x2) comparando-se o número de alelos transmitidos ao filho em relação aos não transmitidos, calculando-se, a partir daí a razão de chances (OR) e o valor de  $p$ .

Os testes de TDT baseiam-se na distorção na transmissão dos alelos de um dos pais heterozigotos para uma prole afetada. Em caso de não-associação com a doença, os alelos (A e B) têm a mesma chance de serem transmitidos de um dos pais heterozigotos. Se, no entanto, um alelo (B) aumenta risco de doença, esse alelo será preferencialmente transmitidos aos filhos afetados. O esquema de amostragem para o TDT é o trio da família, com o DNA disponível a partir de ambos os pais e um único filho afetado. O teste estatístico considera todos os pais heterozigotos (AB), e compara o número de transmissões do alelo A e do alelo B. O TDT trata contribuições dos pais como independentes e, portanto, pressupõe um modelo multiplicativo.

Após a detecção dos alelos de todos os indivíduos, os genótipos foram processados para a análise estatística utilizando o software Jinglefix (Secolin et al., 2008). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (limite do valor de  $p = 0.01$ ) e a frequência alélica mínima (MAF) (limite= 0.05) dos dados foram avaliados pelo software Haploview (Barrett et al., 2005). Para análise de associação baseada em famílias, foi utilizado o programa Unphased (Dudbridge, 2008).

## **VI. RESULTADOS**





### **1. Dados familiares**

A investigação familiar revelou que 21 (77,8%) dos indivíduos afetados do grupo I eram do sexo masculino, e apenas 6 (22,2%) eram do sexo feminino. Dentre os pacientes deste grupo, 20 (74,1%) tiveram ambos os pais genotipados, enquanto que 7 (27,9%) dos pacientes tiveram apenas um dos pais genotipados. Para o grupo II, 20 (80%) dos indivíduos afetados eram do sexo masculino e 5 (20%) eram do sexo feminino. Para este grupo, 18 pacientes (72%) tiveram ambos os pais genotipados e 7 pacientes (28%) tiveram apenas um dos pais genotipados.

### **2. MLPA**

A presença de inserções e deleções no DNA foi investigada pela técnica de MLPA nos 27 indivíduos disléxicos pertencentes ao grupo I, diagnosticados pelo DISAPRE/UNICAMP. Os fragmentos de DNA de cada amostra, resultantes da amplificação das sondas na reação de MLPA, foram identificados por eletroforese capilar e analisados pelo software Genescan (Applied Biosystem). O software Genotyper (Applied Biosystem) foi então utilizado para o reconhecimento das sondas e para a obtenção da área dos picos correspondentes. A técnica de MLPA também foi aplicada a 5 indivíduos controles (não-disléxicos). Os eletroferogramas de 3 indivíduos controles estão representados na Figura 12. As 40 sondas do kit P150 foram amplificadas, e o mesmo padrão de distribuição e de área dos picos foi observado para todos os 5 indivíduos.

A análise dos pacientes disléxicos foi realizada, e em todos os casos, os eletroferogramas mostraram a amplificação das 40 sondas, e nenhum dos 27 indivíduos analisados apresentou aumento ou redução significativos das áreas dos picos em relação aos indivíduos controles. Na Figura 13, os eletroferogramas de um indivíduo normal e de um indivíduo disléxico são comparados, não sendo detectado nenhum desvio aparente no número de cópias das sondas.

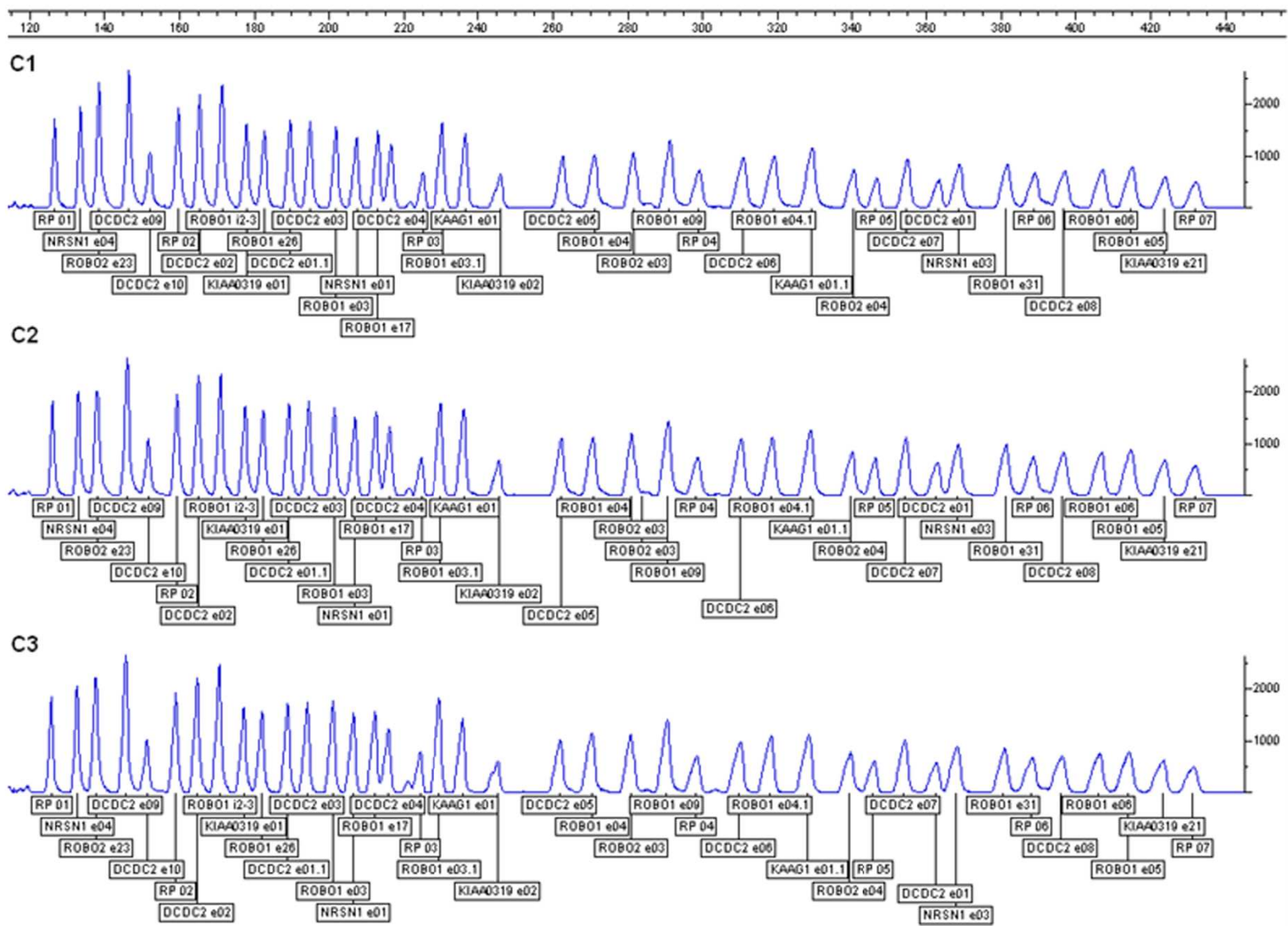


Figura 12 - Eletroferogramas obtidos após a reação MLPA de amostras de indivíduos controles (não disléxicos). Cada pico representa uma sonda, e os genes e exons/introns correspondentes são mostrados nos blocos de texto.

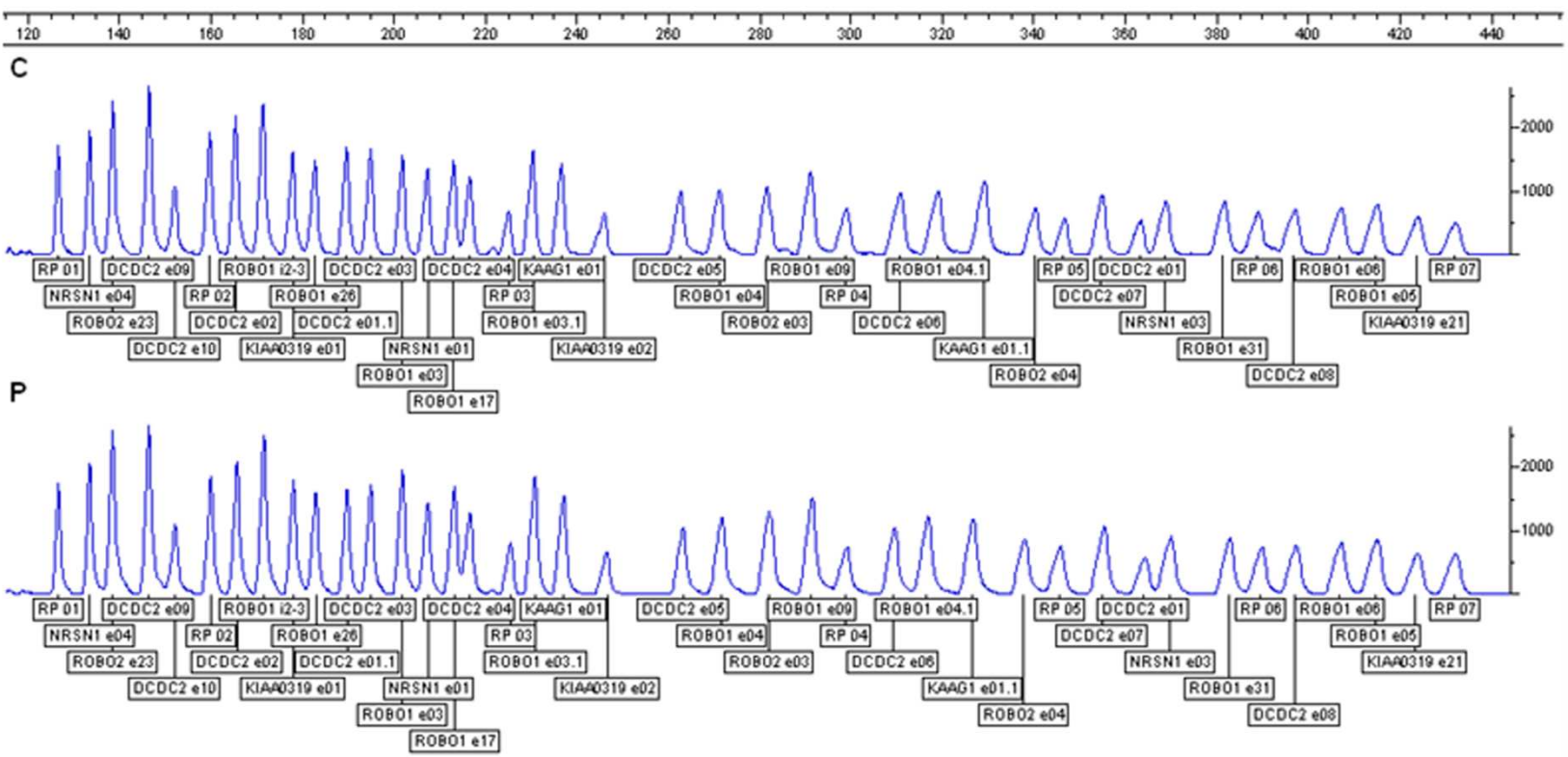


Figura 13 - Eletroferogramas obtidos após a reação MLPA. C) Amostra de um indivíduo controle. P) Amostra de um paciente disléxico.

As áreas dos picos de cada amostra foram normalizadas em planilhas do programa Excel, e gráficos foram gerados para cada indivíduo. O valor 1 foi considerado normal; no caso de deleções em heterozigose, o valor esperado seria aproximadamente de 0,5 (metade do número de cópias); já no caso de deleções em homozigose, o pico correspondente à sonda que se liga na região deletada não apareceria no elerofograma, e conseqüentemente o valor no gráfico seria zero. Nas Figuras 14, 15 e 16, os gráficos normalizados de todos os pacientes estudados são mostrados. Nenhuma amostra mostrou desvio significativo em relação ao valor normal, indicando que nenhuma duplicação ou deleção estavam presentes nas regiões de ligação das sondas do kit SALSA MLPA P150.

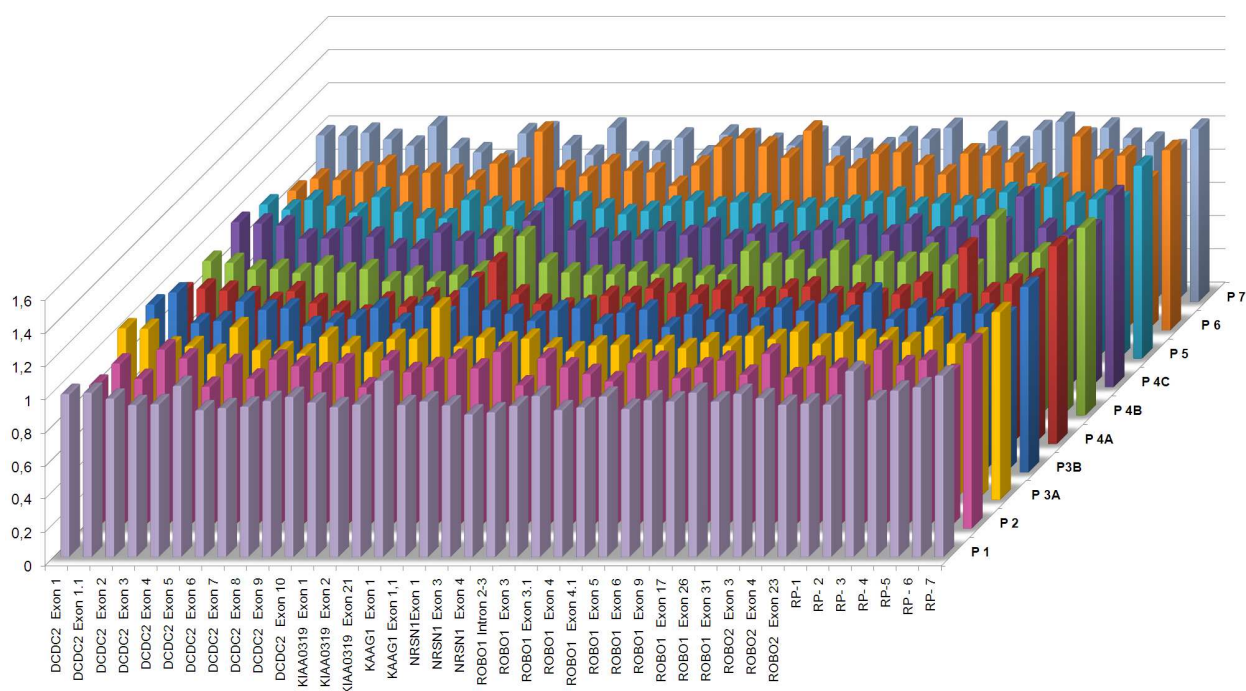


Figura 14 - Gráfico dos resultados normalizados da reação de MLPA. Os genes e exons/introns correspondentes a cada sonda são mostrados no eixo horizontal, e as sondas de referência são nomeadas RP-1 a RP-7. As barras representam os dados normalizados da taxa de amplificação de cada sonda em 10 pacientes disléxicos (P1 – P7).

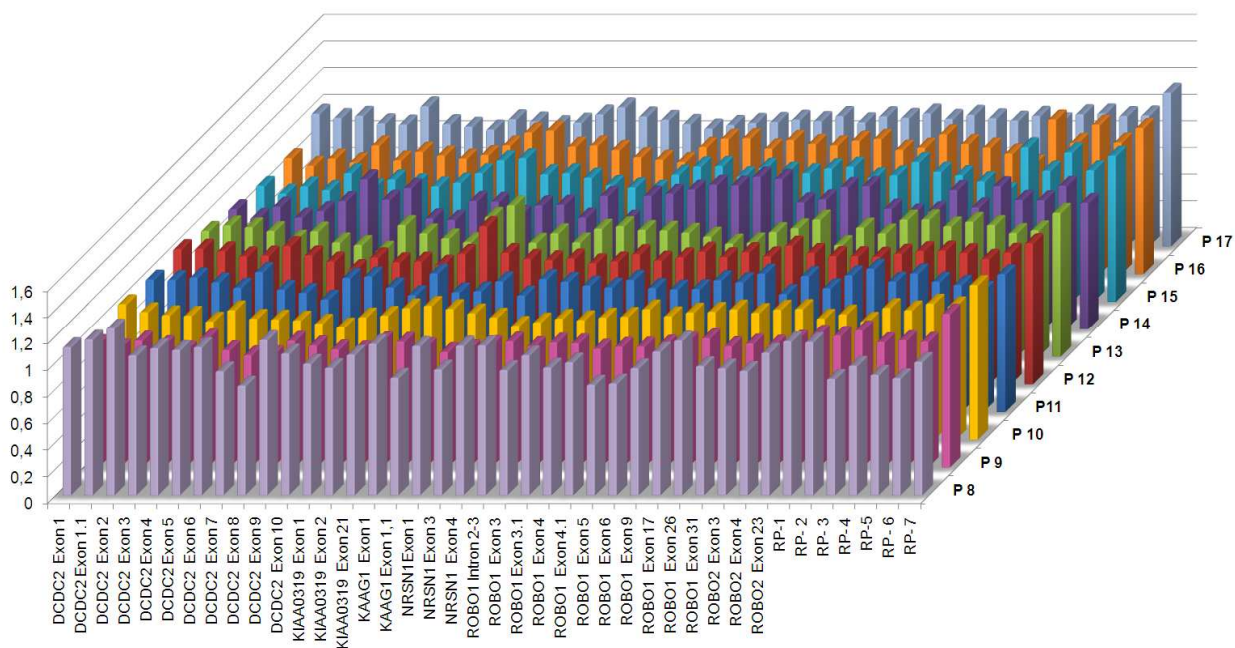


Figura 15 - Gráfico dos resultados normalizados da reação de MLPA de 10 pacientes disléxicos (P8 – P17).

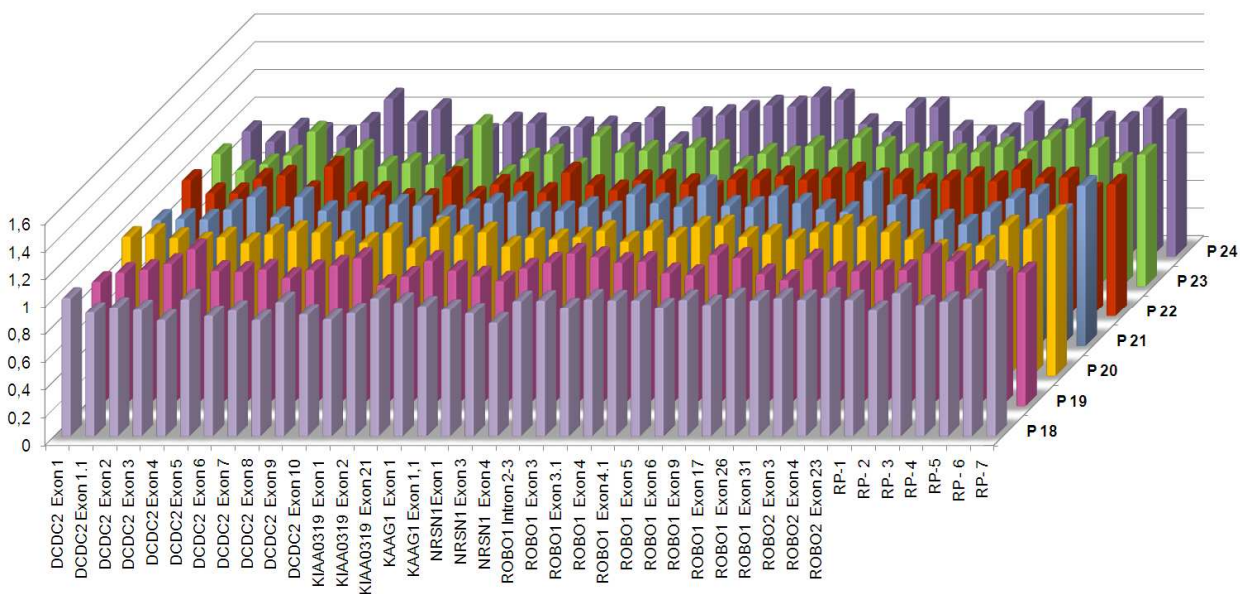


Figura 16 - Gráfico dos resultados normalizados da reação de MLPA de 10 pacientes disléxicos (P18 – P24).



### 3. Estudo de associação do gene *DYX1C1*

A Reação de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando-se o ensaio Taqman para a genotipagem dos alelos. O Teste de Transmissão de Desequilíbrio de ligação (TDT) foi utilizado para verificar a associação dos marcadores com o fenótipo nos dois grupos de famílias.

Os quatro polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) de todos os indivíduos participantes foram genotipados por PCR em tempo real, e a curva de amplificação dos dois alelos foi obtida através da modo quantificação absoluta no programa SDS. Também utilizou-se o modo de discriminação alélica para verificação dos resultados, conforme a Figura 17. Os resultados são plotados pelo programa SDS7500 em um histograma do alelo X versus alelo Y. Os pontos correspondem a cada amostra, e conforme a intensidade da fluorescência emitida, podem ser reconhecidos como possuindo apenas o alelo X, apenas o alelo Y ou ambos os alelos.

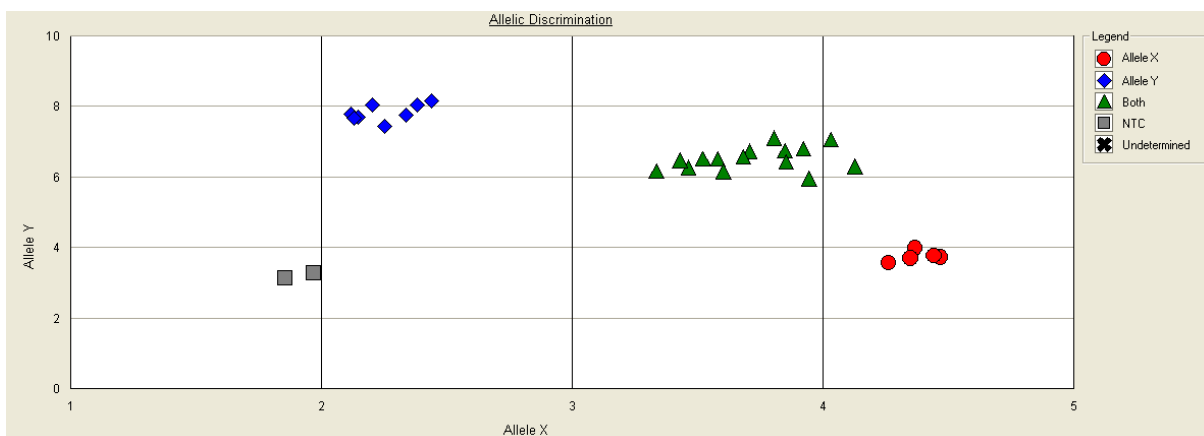


Figura 17 – Gráfico de Discriminação Alélica obtido no programa SDS7500 após a Reação de PCR em Tempo Real.

O poder estatístico para nossa amostra familiar foi maior que 80% em ambos os grupos para detecção de associação. As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados dos grupos I e II, respectivamente, obtidos pelos programas Unphased (Barrett et al., 2005) e Haploview (Dudbridge, 2008). A análise do padrão de desequilíbrio de ligação (DL) foram medidas pelo  $r^2$  de acordo com os parâmetros de Gabriel et al. (2002). Conforme a Figura 18, baixos valores de DL foram observados, porém para o grupo I, foi obtido um  $r^2$  de 0.56 entre os marcadores rs3743205 e rs17819126. O efeito dos SNPs foi avaliado por meio de valores de *Odds ratio* (OR), ou razão de chances; o valor de  $p$ , uma medida informal de evidência contra a hipótese nula; a frequência alélica mínima (MAF) para os marcadores na população estudada, e o valor de

$p$  do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hwpval), o qual avalia a probabilidade de que o desvio do equilíbrio de H-W possa ser explicado pelo acaso.

Conforme demonstrado na Tabela 6, o SNP rs17819126 apresentou frequência mínima do alelo (MAF) menor que 0,05 no grupo II, e portanto ele não foi considerado na análise de associação subsequente desse grupo, para evitar o viés dos resultados devido à baixa frequência de um dos alelos. Os valores de *odds ratio* (OR), indicam o efeito do alelo na determinação do fenótipo, sendo o valor 1 indicativo de que a frequência da transmissão de determinado alelo é igual entre os indivíduos afetados e não afetados, e neste caso, o alelo não possui efeito no fenótipo estudado. A razão de chances (OR) para determinado SNP somente será estatisticamente significativa se a faixa do intervalo de confiança (IC) for menor ou maior que 1, indicando um efeito protetor do alelo ou um efeito de risco do alelo para o fenótipo, respectivamente. Intervalos de confiança são utilizados para indicar a confiabilidade de uma estimativa, e consistem em um intervalo de valores em torno do parâmetro amostral, no qual julgamos, com um risco conhecido de erro, estar o parâmetro da população (Cumming e Finch, 2005).

As análises do IC desse estudo mostraram que todas os intervalos incluem o 1, revelando ausência de associação dos alelos com a dislexia. Além disso, o valor de  $p$  foi alto para todos os alelos, indicando alta probabilidade de que a hipótese nula (de que os alelos não estão associados) seja verdadeira. Geralmente, a hipótese nula é rejeitada quando o valor de  $p$  é inferior a 0,05 ou 0,01, correspondendo respectivamente a 5% ou 1% de chance de rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira (erro tipo I) (Goodman, 1999).

Tabela 5- Resultados do Teste de Trasmissão de Desequilíbrio de ligação para o grupo I.

SNP	Posição	MAF	Hwpval	Valor de $p$	Alelo	OR	95% IC
rs16787	55800837	0.209	1.0	0.404	A:C	0.625	0.167 - 1.952
rs3743205	55790530	0.116	0.891	0.654	C:T	1.5	0.202 - 4.955
rs17819126	55789910	0.058	0.231	0.56	C:T	0.5	0.181 - 22.06
rs57809907	55722882	0.105	0.744	0.705	C:A	0.75	0.023 - 1.712

MAF= Frequência Alélica Mínima, Hwpval= Valor de  $p$  do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR= Razão de Chances. IC= Intervalo de Confiança.

Tabela 6- Resultados do Teste de Trasmissão de Desequilíbrio de ligação para o grupo II.

SNP	Posição	MAF	Hwpval	Valor de <i>p</i>	Alelo	OR	95% IC
rs16787	55800837	0.205	0.467	0.363	A:C	0.571	0.205 - 1.911
rs3743205	55790530	0.102	0.094	1	C:T	1	0.251 - 8.977
rs17819126	55789910	0.034	1.0	0.56	C:T	2	0.045 - 5.514
rs57809907	55722882	0.091	1.0	0.088	C:A	0.2	0.168 - 3.351

MAF= Frequência Alélica Mínima, Hwpval= Valor de *p* do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR= Razão de Chances; IC= Intervalo de Confiança.

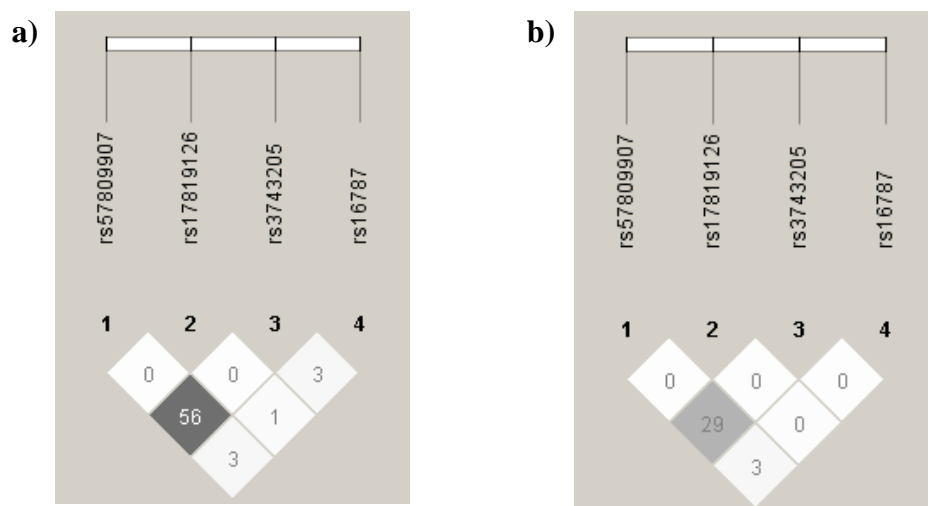


Figura 18 - Mapa de Desequilíbrio de Ligação (DL) obtido da estatística de  $r^2$ . Regiões de DL baixos, são representadas pelas cores mais claras enquanto regiões de DL altos são representadas por cores mais escuras. a) DL entre marcadores no grupo I. B) DL entre marcadores no grupo II.



## VII. DISCUSSÃO

---

A dislexia é um grande obstáculo para o sucesso educativo em escolares, que pode desencadear uma espiral de insucesso, baixa auto-estima, isolamento e desvantagem social. A realização do diagnóstico precoce é essencial para fornecer um adequado monitoramento e para o início da intervenção profissional, com objetivo de minimizar todos esses problemas. Poucos estudos têm sido realizados no Brasil sobre esse transtorno, não há dados oficiais sobre a sua prevalência em nosso meio, e nenhum estudo genético tinha sido realizado até o momento no país. Os estudos dos genes candidatos têm sido conduzidos em diferentes populações, e vários polimorfismos e mutações foram associadas à dislexia. A inconsistência de muitos estudos de genes candidatos aponta para a importância da replicação desses achados em diferentes populações. A investigação adicional para identificar o significado funcional destas alterações pode fornecer a base molecular das influências genéticas sobre a leitura.

A incidência da dislexia depende dos critérios utilizados para definir o transtorno. Como esses critérios variam de acordo com cada país, existe uma notável diferença na prevalência desse distúrbio. Segundo Paulesu et al. (2001) essa diferença ocorre porque muitos países não utilizam uma avaliação neurocognitiva completa para diagnóstico da dislexia, classificando indivíduos com demais tipos de dificuldades em ortografia como disléxicos, superestimando os números. Os dados obtidos pelo Laboratório de Pesquisa em Dificuldades, Distúrbios de Aprendizagem e Transtornos da Atenção (DISAPRE) da UNICAMP, onde foram diagnosticados parte dos indivíduos participantes de nosso estudo, mostraram que apenas 1,7% das crianças encaminhadas com queixas de dificuldades de aprendizagem foram realmente diagnosticadas como tendo dislexia do desenvolvimento. Este achado é valioso, principalmente por não haver uma determinação da prevalência no país. Portanto, esses dados permitem presumir que os disléxicos correspondem a uma minoria da população escolar, sendo que a maioria apresenta apenas dificuldades escolares ou outros distúrbios.

As diferenças nas taxas de prevalência entre os sexos têm sido relatados em estudos epidemiológicos da dislexia (Flannery et al., 2000; Rutter et al., 2004). De acordo com esses estudos, meninos correm maior risco de desenvolver distúrbios de leitura do que as meninas, com proporções de sexo, de 3 meninos: 1 menina. Uma proporção similar de 4 meninos: 1 menina foi obtida em nossa amostra, tanto para o grupo I como para o grupo II. Alguns outros estudos, entretanto, não mostram diferenças significativas na frequência de dificuldades de leitura entre os sexos (Flynn & Rahbar, 1994; Pennington, 2000). Indicando que as diferenças de prevalência

reportadas poderiam ser causadas pelas práticas de encaminhamento feitas por professores, devido aos problemas de comportamento apresentado pelos meninos, conforme proposto por Shaywitz et al. (1992).

Este estudo foi o primeiro a utilizar a técnica de MLPA para investigação de alterações genéticas na dislexia. E mesmo não sendo possível a avaliação dos dois grupos, devido a alguns problemas apresentados pelo aparelho de eletroforese capilar e o curto tempo, nossos resultados são válidos, pois a técnica foi testada em um grupo de 27 pacientes disléxicos, pertencentes a 24 famílias não-relacionadas, diagnosticados por um estrito critério de avaliação.

A análise de MLPA não revelou nenhuma deleção ou duplicação nos seis genes estudados. Algumas possíveis explicações para o fato poderiam ser: a ausência de grandes deleções ou duplicações nos genes estudados que possam explicar o fenótipo, a presença de mutações fora das regiões de ligação das sondas, ou mesmo a baixa frequência de deleções e duplicações nestas regiões analisadas em nossa amostra.

O método mostrou-se reprodutível e o padrão de variação entre as amostras para cada sonda do kit SALSA MLPA P150 foi baixo, mas visando o aprimoramento para estudos futuros, sugerimos algumas modificações neste kit. A primeira delas é a inclusão de sondas para regiões intrônicas que possuam deleções já descritas, principalmente a deleção observada no gene *DCDC2* por Meng et al. (2005). Além disso, seria interessante abranger outras regiões do gene *KIAA0319*, considerando que ele possui 21 exons, e o kit contém apenas 3 sondas para esse gene. Nós também sugerimos a exclusão das sondas para os genes *KAAGI*, *NRSN1* e *ROBO2*, porque mesmo estando muito perto dos genes candidatos, eles não foram relacionados com a dislexia em nenhum estudo. Ao invés deles, a inclusão dos genes *DYX1C1*, *C2ORF3*, *MRPL19* e *KIAA0319L* no kit de MLPA seriam de maior valor, já que evidências de associação com a dislexia para esses genes foram demonstradas em pelo menos dois estudos cada um.

O gene *DYX1C1* foi o primeiro a ser identificado como um gene candidato para a susceptibilidade a dislexia, e seu papel no controle da migração neuronal durante a embriogênese e efeito sobre o aprendizado em roedores foram verificados. A associação dos dois polimorfismos rs3743205 e rs57809907 foi encontrada por Taipale et al. (2003) em um estudo desse gene. Porém, vários estudos independentes analisaram esses marcadores produzindo resultados conflitantes. A análise dos efeitos alelo-específicos sobre a regulação gênica sugeriu um papel funcional para o SNP rs3743205, bem como para o marcador rs16787 do gene *DYX1C1* (Tapia-

Paez et al. 2008). Além disso, uma associação significativa foi observada por Bates et al. (2010) para a variante missense rs17819126, que adquiriu importância por possuir uma base funcional potencial para associação do gene *DYX1C1* com a dislexia.

Os estudos de replicação em diferentes amostras utilizando outras estratégias de mapeamento são importantes para confirmar os resultados já relatados. Com esse intuito, nosso estudo avaliou os 4 *Single Nucleotide Polymorphisms* (rs16787, rs3743205, rs17819126 e rs57809907) utilizando uma abordagem de associação baseada em famílias, em dois grupos de indivíduos disléxicos brasileiros diagnosticados por equipes interdisciplinares distintas. Nossa amostra obteve um poder estatístico significativo, no entanto não revelou associação dos marcadores estudados com a dislexia em nenhum dos grupos, nem para a amostra como um todo. As aparentes discrepâncias de nossos resultados com estudos anteriores podem explicar-se por elementos-chaves como: as diferenças na definição do fenótipo, a ancestralidade da amostra, o desenho do estudo, e as interações com efeitos ambientais que diferem entre populações.

A ausência de associação observada para os marcadores rs3743205 e rs57809907 corrobora com os resultados de Bellini et al. (2005), Cope et al. (2005) e Meng et al. (2005). Embora os alelos de risco proposto por Taipale et al. (2003), não devam ser um fator causal na dislexia, o fato de que os mesmos SNPs mostraram associação em pelo menos 3 estudos independentes, mesmo que alguns sejam em direção oposta, é intrigante. Uma explicação simples, e que é consistente com os quatro estudos que não encontraram qualquer associação, é que os resultados que obtiveram associação poderiam ser falso positivos.

O polimorfismo rs16787, localizado na região promotora do gene, foi proposto como sendo um sítio de ligação a fatores de transcrição do gene *DYX1C1*, mas em nosso estudo, também não mostrou associação dos alelos com a dislexia.

Com relação ao marcador rs17819126, somente o grupo I foi considerado, e nosso resultado se opôs ao descrito por Bates et al. (2010). Sendo uma mutação *missense* este poderia ser um marcador funcional para a dislexia, porém nossos resultados não confirmaram a associação. Como a frequência alélica mínima (MAF) para esse marcador foi muito baixa, seria interessante avaliá-lo em um grupo amostral maior.

Esses resultados não descartam a participação do gene *DYX1C1* na etiologia da dislexia, pois, com base na ferramenta *SNPtagger* do programa Haploview, seria necessário genotipar um total de 17 SNPs para se obter a cobertura integral desse gene. E isso seria inviável ao nosso

estudo, pois o poder estatístico seria reduzido devido ao pequeno número de indivíduos participantes da pesquisa. Portanto o aumento do número da amostra e de marcadores para estudos posteriores é fundamental para que se possa fazer uma correta inferência do envolvimento de *DYX1C1* na dislexia.

A identificação de mutações em genes candidatos poderia, no futuro, abrir a possibilidade de diagnosticar precocemente os distúrbios de leitura através de avaliação genética, mas existem vários níveis de análise, que precisam ser concluídos antes que estas previsões sejam clinicamente úteis. Mesmo quando mutações causais forem identificadas, elas deverão ser consideradas no contexto de um quadro multifatorial para obter previsões precisas sobre o estado de diagnóstico.

## VIII. CONCLUSÕES

---

- Os dados obtidos pelo Laboratório de Distúrbios de Aprendizagem da UNICAMP permitem presumir que os disléxicos correspondem a uma minoria da população escolar, sendo que a maioria apresenta apenas dificuldades escolares ou outros distúrbios. Além disso, uma proporção de 4 meninos: 1 menina foi obtida nas amostras estudadas, esses dados, portanto, corroboram com alguns outros estudos que mostraram uma maior prevalência desse distúrbio em indivíduos do sexo masculino.
- Esse estudo foi o primeiro a utilizar a técnica de MLPA para investigação de alterações genéticas na dislexia, porém nenhuma deleção ou duplicação nos seis genes estudados foi identificada. Uma explicação possível ao fato seria a ausência de grandes deleções ou duplicações nos genes estudados que possam causar o fenótipo. Visando o aprimoramento do kit para estudos futuros, foram sugeridas algumas modificações no kit SALSA MLPA P150.
- Nossos dados sugerem que os SNPs rs16787, rs3743205, rs17819126 e 57809907 não estão associados com a dislexia.
- Esse resultado não descarta o envolvimento do gene *DYX1C1* nesse distúrbio de aprendizagem, novos estudos devem ser realizados em nossa população utilizando um maior número amostral e uma cobertura mais ampla de marcadores para que se possa afirmar ou não o envolvimento de *DYX1C1* na etiologia da dislexia.

## **IX. REFERÊNCIAS**

---



- Abaurre MBM. Linguística e Psicopedagogia. Em: Scoz, E. Rubinstein, EMM. Rossa, LMC. Barone (orgs.), Psicopedagogia: **O Caráter Interdisciplinar na Formação e Atuação Profissional**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda 186-216, 1987
- Andrade A, Di Bernardi L, Barros ML. Coordenação motora fina em crianças em idade escolar: demandas da sala de aula. **Temas de Desenvolvimento** 12(69):33-39, 2004
- Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ. Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. **Development** 133:22, 2006
- Anthoni H, Zucchelli M, Matsson H, Müller-Myhsok B, Fransson I, Schumacher J. A locus on 2p12 containing the co-regulated MRPL19 and C2ORF3 genes is associated to dyslexia. **Hum Mol Genet** 16: 667–677, 2007
- Associação Brasileira de Dislexia (ABD). Disponível em: <<http://www.dislexia.org.br/>>. Acesso em: Julho/2009.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 21(2):263-5. 2005.
- Bates TC, Lind PA, Luciano M, Montgomery GW, Martin NG, Wright MJ. Dyslexia and DYX1C1: deficits in reading and spelling associated with a missense mutation. **Mol Psychiatry** 15(12):1190-6, 2010
- Bates TC, Luciano M, Medland SM, Montgomery GW, Wright MJ, Martin NG. Genetic Variance in a Component of the Language Acquisition Device: *ROBO1* Polymorphisms Associated with Phonological Buffer Deficits. **Behav Genet** 41(1):50-7, 2011.
- Beaton AA. The relation of planum temporale asymmetry and morphology of the corpus callosum to handedness, gender, and dyslexia: a review of the evidence. [Review]. **Brain Lang** 60: 255–322, 1997.
- Bellini G. et al. No evidence for association between dyslexia and DYX1C1 functional variants in a group of children and adolescents from Southern Italy. **J Mol Neurosci** 27, 311–314, 2005.
- Bisgaard ML, Eiberg H, Moller N, et al. Dyslexia and chromosome 15 heteromorphism: negative lod score in a Danish material. **Clin Genet** 32(2):118–119, 1987.
- Boder E. Development dyslexia: a diagnostic approach based on three atypical reading-spelling patterns. **Develop Med Child Neurol** 15, p.663-687, 1973.

- Bordin IAS, Mari JJ, Caeiro MF. Validação da versão brasileira do Child Behavior Checklist (CBCL) (Inventário de Comportamentos da Infância e da Adolescência): dados preliminares. **Revista ABP – APAL**, São Paulo, v. 17, n. 2, 1995.
- Brkanac Z, Chapman NH, Matsushita MM, et al. Evaluation of candidate genes for DYX1 and DYX2 in families with dyslexia. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 144(4):556–560, 2007.
- Byrne B, Fielding-Barnsley R. Evaluation of a program to teach phonemic awareness to young children. **Journal of Educational Psychology** 83(3), 451-455, 1991.
- Capovilla, AGS, Capovilla, FC Prova de Consciência Fonológica: desenvolvimento de dez habilidades da pré-escola à segunda série. **Temas sobre Desenvolvimento**, 7(37), 14-20, 1998.
- Capovilla AGS. Compreendendo a dislexia: definição, avaliação e intervenção. **Cadernos de Psicopedagogia** v. 1, n. 2, p. 36-59, 2002.
- Capovilla AGS, Capovilla FC. **Alfabetização: método fônico**. São Paulo: Memnon. 2004.
- Capovilla FC, Capovilla AGS. **Problemas de Leitura e Escrita: como identificar, prevenir e remediar numa abordagem fônica**. 4ª edição. Ed. Memnon. 2004.
- Cardon LR, Smith SD, Fulker DW, Kimberling WJ, Pennington BF, DeFries JC. Quantitative trait locus for reading disability on chromosome 6. **Science**. Oct 14; 266(5183):276-9, 1994.
- Castles A, Datta H, Gayan J, et al. Varieties of developmental reading disorder: genetic and environmental influences. **J Exp Child Psychol** 72(2):73–94, 1999.
- Chapman NH, Igo RP, Thomson JB, et al. Linkage analyses of four regions previously implicated in dyslexia: confirmation of a locus on chromosome 15q. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 131B(1):67–75, 2004.
- Chen WM, Deng HW. A general and accurate approach for computing the statistical power of the transmission disequilibrium test for complex disease genes. **Genetic Epidemiol** 21:53-67, 2001.
- Cope N, Harold D, Hill G, Moskvina V, Stevenson J, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC, Williams J. Strong evidence that KIAA0319 on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. **Am J Hum Genet** 76, 581–591, 2005.
- Cope NA, et al. No support for association between dyslexia susceptibility 1 candidate 1 and developmental dyslexia. **Mol Psychiatry** 10, 237–238, 2005.
- Couto JM, Gomez L, Wigg K, et al. The KIAA0319-like (KIAA0319L) gene on chromosome 1p34 as a candidate for reading disabilities. **J Neurogenet** 22(4):295–313, 2008.

- Couto JM, Gomez L, Wigg K, et al. Association of attention-deficit/hyperactivity disorder with a candidate region for reading disabilities on chromosome 6p. **Biol Psychiatry** 66(4):368–375, 2009.
- Cumming G, Finch S. Inference by eye: Confidence intervals, and how to read pictures of data. **American Psychologist**, 60, 170–180, 2005.
- Cunha JA, Trentini CM, Argimon IL, Oliveira MS, Werlang BG, Prieb RG. **Adaptação e padronização brasileira do teste Wisconsin de classificação de cartas** (1. Ed). São Paulo: Casa do Psicólogo, 2005.
- Cunningham AE. Explicit versus implicit instruction in phonemic awareness. **Journal of Experimental Child Psychology**, n. 50, 429-44, 1990.
- Dahdouh F, Anthoni H, Tapia-Páez I, Peyrard-Janvid M, Schulte-Körne G, Warnke A, Remschmidt H, Ziegler A, Kere J, Müller-Myhsok B, Nöthen MM, Schumacher J, Zucchelli M. Further evidence for DYX1C1 as a susceptibility factor for dyslexia. **Psychiatr Genet** Apr;19(2):59-63, 2009.
- Deffenbacher KE, Kenyon JB, Hoover DM, et al. Refinement of the 6p21.3 quantitative trait locus influencing dyslexia: linkage and association analyses. **Hum Genet** 115(2): 128–138, 2004.
- DeFries JC, Alarcon M. Genetics of specific reading disability. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev** 2: 39-47, 1996.
- Demonet JF, et al. **Developmental dyslexia**. *Lancet* 363, 1451–1460, 2004.
- Denckla MB, Rudel RG. Rapid “automatized” naming of pictured objects, colors, letters and numbers by normal children. **Cortex** 10: 186-202, 1974.
- Dennis MY, Paracchini S, Scerri TS, et al. A common variant associated with dyslexia reduces expression of the KIAA0319 gene. **PLoS Genet** 5(3):e1000436, 2009.
- Dewey D. What is developmental dyspraxia? [Review]. **Brain Cogn** 29: 254–74, 1995.
- Doyle J. **Dyslexia: an introductory guide**. San Diego (CA): Singular Publishing, Inc. 1996.
- Dronkers NF, Plaisant O, Iba-Zizen MT, Cabanis EA. Paul Broca’s historic cases: high resolution MR imaging of the brains of Leborgne and Lelong. **Brain** 130:1432–1441, 2007.
- DSM IV-TR. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Tradução de Cláudia Dornelles. 4. ed. Revisada. Porto Alegre: Artmed, 82, 2002.

- Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing Genotype Data. **Hum Hered** 66:87–98, 2008.
- Eckert M. Neuroanatomical markers for dyslexia: a review of dyslexia structural imaging studies. **Neuroscientist** 10, 362–371, 2004.
- Eden GF, Moats L. The role of neuroscience in the remediation of students with dyslexia. *Nature Neuroscience*, New York; v. 5, p. 1080-1084, 2002.
- Ellis AW. **Leitura, escrita e dislexia. Uma análise cognitiva**. 2.ed Porto Alegre: Artes Médicas. 1995.
- Evangelou E, Trikalinos TA, Salanti G, Ioannidis JP. Evangelou E, Trikalinos TA, Salanti G, Ioannidis JP. Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations. **PLoS Genet** 2(8):e123, 2006.
- Fagerheim T, Raeymaekers P, Tonnessen FE, Pedersen M, Tranebjaerg L, Lubs HA. A new gene (DYX3) for dyslexia is located on chromosome 2. **J Med Genet** 36(9): 664-9, 1999.
- Fawcett AJ, Nicolson RI, Dean P. Impaired performance of children with dyslexia on a range of cerebellar tasks. **Ann Dyslexia** 46: 259–83, 1996.
- Fiez JA, Petersen SE. Neuroimaging studies of word reading. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:914–921, 1998.
- Figueiredo VLM. **WISC III**. Em J. A. Cunha (Org.), *Psicodiagnóstico V*. (pp. 603-614). Porto Alegre: Artmed. 2002.
- Fisher SE, Marlow AJ, Lamb J, Maestrini E, Williams DF, Richardson AJ, Weeks DE, Stein JF, Monaco AP. A quantitative-trait *locus* on chromosome 6p influences different aspects of developmental dyslexia. **Am J Hum Genet** 64: 146-156, 1999.
- Fisher SE, DeFries JC. Developmental dyslexia: genetic dissection of a complex cognitive trait. **Nat Rev Neurosci** 3, 767–780, 2002.
- Fisher SE, Francks C, Marlow AJ, et al. Independent genome-wide scans identify a chromosome 18 quantitative-trait locus influencing dyslexia. **Nat Genet** 30(1):86–91, 2002
- Flannery KA, Liederman J, Daly L, Schultz J. Male prevalence for reading disability is found in a black and white children free from ascertainment bias. **J Int Neuropsychol Soc** 6(4):433-42, 2000.
- Flynn JM, Rahbar MH. Prevalence of reading failure in boys compared with girls. **Psychology in the Schools** 31, 66–71, 1994.

- Francks C, Paracchini S, Smith SD, et al. A 77-kilobase region of chromosome 6p22.2 is associated with dyslexia in families from the United Kingdom and from the United States. **Am J Hum Genet** 75(6):1046–1058, 2004.
- Frith U. Brain, mind and behavior in dyslexia. In: C. Hulme, & M. Snowling, **Dyslexia: Biology, Cognition and Intervention** (pp. 1-19). London: Whurr Publishers Ltd. 1997.
- Froster U, Shulte Korne G, Hebebrand J, et al. Cosegregation of balanced translocation (1; 2) with retarded speech development and dyslexia. **Lancet** 8864: 178-179, 1993.
- Fulker DW, Cardon LR, DeFries JC, Kimberling WJ, Pennington BF, Smith SD. Multiple regression of sib-pair data on reading to detect quantitative trait loci. **Read Writ** 3: 299–313, 1991.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science** 296: 2225–2229, 2002.
- Galaburda AM, Kemper TL. Cytoarchitectonic abnormalities in developmental dyslexia: a case study. **Ann Neurol** 6(2): 94-100, 1979.
- Galaburda AM, Sherman GF, Rosen GD, Aboitiz F, Geschwind N. "Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies". **Annals of Neurology** 18 (2): 222–33, 1985.
- Galaburda AM, Menard MT, Rosen GD. Evidence for aberrant auditory anatomy in developmental dyslexia. **Proc Natl Acad Sci USA** 91 (17):8010-8013, 1994.
- Galaburda AM, LoTurco J, Ramus F, Fitch RH, Rosen GD. From genes to behavior in developmental dyslexia. **Nat Neurosci** 9:1213–1217, 2006.
- Gayán J, Olson RK. Genetic and environmental influences on individual differences in printed word recognition. **J Exp Child Psychol** 84(2): 97-123, 2003.
- Gayán J, Smith SD, Cherny SS, Cardon LR, Fulker DW, Brower AM, Olson RK, Pennington BF, DeFries JC. Quantitative-trait *locus* for specific language and reading deficits on chromosome 6p. **Am J Hum Genet** 64: 157-164, 1999.
- Gilger JW, Pennington BF, DeFries JC. A twin study of the etiology of comorbidity – attention deficit hyperactivity disorder in dyslexia. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 31(2):343-348, 1992.
- Godfrey JJ, Syrdal-Lasky AK, Millay KK, Knox CM. Performance of dyslexic children on speech perception tests. **J Exp Child Psychol** 32: 401–24, 1981.
- Goodman, SN. Toward Evidence-Based Medical Statistics. 1: The P Value Fallacy. **Annals of Internal Medicine** 130:995-1004, 1999.

- Goodwin W. **An Introduction to Forensic Genetics**. Chichester, England. 107p, 2007.
- Grigorenko EL, Wood FB, Meyer MS, Hart LA, Speed WC, Shuster A, Pauls DL. Susceptibility loci for distinct components of developmental dyslexia on chromosomes 6 and 15. **Am J Hum Genet** 60: 27-39, 1997.
- Grigorenko EL, Wood FB, Meyer MS, Pauls DL. Chromosome 6p influences on different dyslexia-related cognitive processes: further confirmation. **Am J Hum Genet** 66(2): 715-23, 2000.
- Grigorenko EL, Wood FB, Meyer MS et al. Linkage studies suggest a possible locus for developmental dyslexia on chromosome 1p. **Am J Med Genet** 105(1):120–129, 2001.
- Gross-Tsur V, Shalev RS, Manor O, Amir N. Developmental right-hemisphere syndrome: clinical spectrum of the nonverbal learning disability. **J Learn Disabil** 28: 80–6, 1995.
- Gross-Tsur V, Manor O, Shalev RS. Developmental dyscalculia: prevalence and demographic features. **Dev Med Child Neurol** 38: 25–33, 1996.
- Guerreiro CAM. Epilepsias: introdução. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM. **Epilepsia**. São Paulo: Lemos Editorial: 11-18, 1993.
- Hallgren B. Specific dyslexia (congenital word-blindness); a clinical and genetic study. **Acta Psychiatr Neurol Suppl** 65: 1-287, 1950.
- Hannula-Jouppi K, Kaminen-Ahola N, Taipale M, Eklund R, Nopola-Hemmi J, Kaariainen H, et al. The axon guidance receptor gene ROBO1 is a candidate gene for developmental dyslexia. **PLOS Genetics** 1:467–474, 2005.
- Harold D, Paracchini S, Scerri T, et al. Further evidence that the KIAA0319 gene confers susceptibility to developmental dyslexia. **Mol Psychiatry** 11(12):1085–1091; 1061, 2006.
- Haslum MN, Miles TR. Motor performance and dyslexia in a national cohort of 10-year-old children. **Dyslexia** 13(4):257–275, 2007.
- Henry, MK. "Structured, sequential, multisensory teaching: The Perlow legacy". **Annals of Dyslexia**, 1998.
- Hinshelwood J. **Congenital Word-Blindness** (Lewis, London). 1917.
- Horwitz B, Rumsey JM, Donohue BC. Functional connectivity of the angular gyrus in normal reading and dyslexia. **Proc Natl Acad Sci USA**; 95(15): 8939-44, 1998.

- Howard D, Patterson K, Wise R, Brown WD, Friston K, Weiller C, Frackowiak R. The cortical localization of the lexicons. Positron emission tomography evidence. **Brain**, 115 (6), 1769-1782, 1992.
- Hsiung GY, Kaplan BJ, Petryshen TL, et al. A dyslexia susceptibility locus (DYX7) linked to dopamine D4 receptor (DRD4) region on chromosome 11p15.5. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 125(1):112–119, 2004.
- Ianhez ME, Nico MA. **Nem sempre é o que parece: como enfrentar a dislexia e os fracassos escolares**. São Paulo: Alegro. 2002.
- Kaminen N, Hannula-Jouppi K, Kestila M, Lahermo P, Muller K, Kaaranen M, Myllyluoma B, Voutilainen A, Lyytinen H, Nopola-Hemmi J, et al. A genome scan for developmental dyslexia confirms linkage to chromosome 2p11 and suggests a new locus on 7q32. **J Med Genet** 40, 340–345, 2003.
- Kandel ER, Schwartz JH. Brain and Behavior. In: **Principles of Neural Sciences**. 2nd Edition. Elsevier. 1985.
- Kaplan DE, Gayan J, Ahn J, et al. Evidence for linkage and association with reading disability on 6p21.3–22. **Am J Hum Genet** 70(5):1287–1298, 2002.
- Kessler TM. Estudo da memória de trabalho em pré-escolares. 36 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 1997.
- Kidd, T. et al. Roundabout controls axon crossing of the CNS and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. **Cell**, 92: 205–215. 1998.
- Kovel CG, Hol FA, Heister JG, et al. Genomewide scan identifies susceptibility locus for dyslexia on Xq27 in an extended Dutch family. **J Med Genet** 41:652–7, 2004.
- Kuhn MR, Stahl SA. Fluency: A review of developmental and remedial practices. **Journal of Educational Psychology**, 95, 3–21, 2003.
- Lent R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de Neurociência**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.
- Lewis CM. Genetic association studies: Design, analysis and Interpretation. **Brief Bioinform** 3 (2), 146–153, 2002.
- Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. **Genetics** 120 (3), p.849-52, 1988.

- Livingstone MS, Rosen GD, Drislane FW, Galaburda AM. Physiological and anatomical evidence for a magnocellular defect in developmental dyslexia. **Proc Nat Acad Sci** 88:7943-7947, 1991.
- LoTurco JJ, Wang Y, Paramasivam M. Neuronal migration and dyslexia susceptibility In: **The Dyslexic Brain: New Pathways in Neuroscience Discovery** (ed. Rosen, G.D.) 119–128 Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, New Jersey, 2006.
- Ludwig KU, Roeske D, Schumacher J, Schulte-Körne G, König IR, Warnke A, Plume E, Ziegler A, Remschmidt H, Müller-Myhsok B, Nöthen MM, Hoffmann P. Investigation of interaction between DCDC2 and KIAA0319 in a large German dyslexia sample. **J Neural Transm** 115(11):1587-9, 2008.
- Ludwig KU, Schumacher J, Schulte-Körne G, et al. Investigation of the DCDC2 intron 2 deletion/compound short tandem repeat polymorphism in a large German dyslexia sample. **Psychiatr Genet** 18(6):310–312, 2008.
- Lyon GR, Shaywitz SE, Shaywitz BA. Defining dyslexia, comorbidity, teacher's knowledge of language and reading. **Annals of Dyslexia** 53:1-14, 2003.
- Marino C, Giorda R, Vanzin L, et al. No evidence for association and linkage disequilibrium between dyslexia and markers of four dopamine-related genes. **Eur Child Adolesc Psychiatry** 12(4):198–202, 2003.
- Marino C, Giorda R, Vanzin L, et al. A locus on 15q15-15qter influences dyslexia: further support from a transmission/disequilibrium study in an Italian speaking population. **J Med Genet** 41:42–6, 2004.
- Marino C, et al. A family-based association study does not support DYX1C1 on 15q21.3 as a candidate gene in developmental dyslexia. **Eur J Hum Genet** 13, 491–499, 2005.
- Marino C, Citterio A, Giorda R, Facoetti A, Menozzi G, Vanzin L, Lorusso ML, Nobile M, Molteni M. Association of short-term memory with a variant within DYX1C1 in developmental dyslexia. **Genes, Brain and Behavior** 6: 640–646, 2007.
- Marlow AJ, Fisher SE, Francks C, et al. Use of multivariate linkage analysis for dissection of a complex cognitive trait. **Am J Hum Genet** 72:561–70, 2003.
- McGrath LM, Smith SD, Pennington BF. Breakthroughs in the search for dyslexia candidate genes. **Trends Mol Med** 12(7):333-41, 2006.



- Meda SA, Gelernter J, Gruen JR, et al. Polymorphism of DCDC2 reveals differences in cortical morphology of healthy individuals-A preliminary voxel based morphometry study. **Brain Imaging Behav** 2(1):21–26, 2008.
- Meneses A. Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory. **Rev Neurosci** 9: 275-289, 1998.
- Meng H, Smith SD, Hager K, Held M, Liu J, Olson RK, et al. DCDC2 is associated with reading disability and modulates neuronal development in the brain. **Proc Nat Acad Sci USA** 102:17053–17058, 2005.
- Moojen SM, Dorneles BV, Costa A. Avaliação psicopedagógica no TDAH. In: Rohde LA e Mattos P (eds.) **Princípios e Práticas em TDAH**. Artmed, Porto Alegre, pp. 107-16, 2003.
- Morgan AE, Hynd GW. Dyslexia, neurolinguistic ability, and anatomical variation of the planum temporale. **Neuropsychol Rev** 8: 79–93, 1998.
- Morris DW, Robinson L, Turic D, et al. Family-based association mapping provides evidence for a gene for reading disability on chromosome 15q. **Hum Mol Genet** 9:843–8, 2000.
- MRC-Holland b.v. Disponível em <<http://www.mrc-holland.com>> (último acesso em: dez/2010).
- National Reading Panel. Report of the subgroups: National Reading Panel. Washington, DC: **National Institute of Child Health and Development**. 2000.
- Nicolson RI, Fawcett AJ, and Dean P. Developmental dyslexia: The cerebellar deficit hypothesis. **Trends in Neurosciences** 24(9): 508-511, 2001.
- Nopola-Hemmi J, Myllyluoma B, Haltia T, Taipale M, Ollikainen V, Ahonen T, Voutilainen A, Kere J, Widén E. A dominant gene for developmental dyslexia on chromosome 3. **J Med Genet** 38(10): 658-64, 2001.
- Nopola-Hemmi J, Taipale M, Haltia T, Lehesjoki AE, Voutilainen A, Kere J. Two translocations of chromosome 15q associated with dyslexia. **J Med Genet** 37: 771-5, 2000.
- Novick BZ, Arnold MM. **Fundamentals of Clinical Child neuropsychology**. Philadelphia, PA: Grune & Stratton, 1988.
- Orton ST. "Specific reading disability—strephosymbolia". **JAMA** 90 (14): 1095-1099, 1928.
- Orton, S (1925). Word blindness in school children. **Archives of Neurology and Psychiatry**, 581-615.

- Paracchini S, Thomas A, Castro S, Lai C, et al. The chromosome 6p22 haplotype associated with dyslexia reduces the expression of KIAA0319, a novel gene involved in neuronal migration. **Hum Mol Genet** 15:1659–66, 2006.
- Paulesu E, Démonet JF, Fazio F, McCrory E, Chanoine V, Brunswick N, Cappa SF, Cossu G, Habib M, Frith CD, Frith U. Dyslexia: cultural diversity and biological unity. **Science** 291(5511):2165-7, 2001.
- Pennington BF, Gilger JW, Pauls D, Smith SA, Smith SD, DeFries JC. Evidence for major gene transmission of developmental dyslexia. **JAMA** 266(11): 1527-34, 1991.
- Petryshen TL, Kaplan BJ, Fu Liu M, et al. Evidence for a susceptibility locus on chromosome 6q influencing phonological coding dyslexia. **Am J Med Genet** 105:507–17, 2001.
- Petryshen TL, Kaplan BJ, Hughes ML, Tzenova J, Field LL. Supportive evidence for the DYX3 dyslexia susceptibility gene in Canadian families. **J Med Genet** 39: 125-6, 2002.
- Peyrard-Janvid M, Anthoni H, Onkamo P, Lahermo P, Zucchelli M, Kaminen N, Hannula-Jouppi K, Nopola-Hemmi J, Voutilainen A, Lyytinen H, et al. Fine mapping of the 2p11 dyslexia locus and exclusion of TACR1 as a candidate gene. **Hum Genet** 114, 510–516. 2004.
- Pinheiro AMV. **Leitura e Escrita: Uma abordagem cognitiva**. Campinas, SP: Editorial Psy. 1994.
- Pinheiro AMV. Dificuldades específicas de leitura: a identificação de déficits cognitivos e a abordagem do processamento de informação. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**. 11 (2): 107-115, 1995.
- Poelmans G, Engelen JJ, Van Lent-Albrechts J, Smeets HJ, Schoenmakers E, Franke B, et al. Identification of novel dyslexia candidate genes through the analysis of a chromosomal deletion. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 150B(1):140-7, 2009.
- Poon MW, Tsang WH, Chan SO, Li HM, Ng HK, Wayne MM. Dyslexia-Associated Kiaa0319-Like Protein Interacts with Axon Guidance Receptor Nogo Receptor 1. **Cell Mol Neurobiol** 31(1):27-35, 2010.
- Pugh, K, et al. Functional neuroimaging studies of reading and reading disability (developmental dyslexia). **Ment Retard Dev Disabil Res Rev** 6, p. 207-213, 2000.
- Rabin M, Wen XL, Hepburn M, et al. Suggestive linkage of developmental dyslexia to chromosome 1p34–p36. **Lancet** 342(8864):178, 1993.
- Ramus F, Rosen S, Dakin SC, et al. Theories of developmental dyslexia: insights from a multiple case study of dyslexic adults. **Brain** 126 (4):841-865, 2003.

- Rapin I, Allen DA. Syndromes in developmental dysphasia and adult aphasia. In: Plum F, editor. **Language, communication, and the brain**. New York: Raven Press. p. 57–75, 1988.
- Rayner K, et al. How psychological science informs the teaching of reading. **Psychological Sciences in the Public Interest** v. 2, n. 2, 2001.
- Reed MA. Speech perception and the discrimination of brief auditory cues in reading disabled children. **J Exp Child** 48(2):270-92, 1989.
- Risch N, Merikangas. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, 273, p.1516, 1996.
- Rosen GD, Bai J, Wang Y, Fiondella CG, Threlkeld SW, Loturco JJ, et al. Disruption of neuronal migration by RNAi of *Dyx1c1* results in neocortical and hippocampal malformations. **Cereb Cortex** 17(11):2562–2572, 2007.
- Rotta NT, Pedroso FS. Transtorno da Linguagem escrita-dislexia. In: Rotta, NT, Ohlweiler L, Riesgo RS. **Transtornos da Aprendizagem-Abordagem Neurobiológica e Multidisciplinar**. Porto Alegre: Artmed, p. 151-164, 2006.
- Rumsey JM, et al. Normal activation of frontotemporal language cortex in dyslexia, as measured with oxygen 15 positron emission tomography. **Archives of Neurology** 51, p.27- 38, 1991.
- Salgado CA, Pinheiro A, Tabaquim MLM, Ciasca SM, Capellini AS. Avaliação fonoaudiológica e neuropsicológica na dislexia do desenvolvimento do tipo mista: relato de caso. **Revista Salusvita** 25(1):91-103, 2006.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- Scerri TS, et al. Putative functional alleles of *DYX1C1* are not associated with dyslexia susceptibility in a large sample of sibling pairs from the UK. **J Med Genet** 41, 853–857, 2004.
- Scerri TS, Paracchini S, Morris A, Macphie IL, Talcott J, Stein J, Smith SD, Pennington BF, Olson RK, Defries JC, Monaco AP. Identification of candidate genes for dyslexia susceptibility on chromosome 18. **PLoS One** 28;5(10):e13712, 2010.
- Schouten JP, Mcelgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res** 30(12):e57, 2002.

- Schulte-Korne G, Grimm T, Nothen MM, Muller-Myhsok B, Cichon S, Vogt IR, et al. Evidence for linkage of spelling disability to chromosome 15. **Am J Hum Genet** 63: 279–282, 1998.
- Schumacher J, Anthoni H, Dahdouh F, et al. Strong genetic evidence of DCDC2 as a susceptibility gene for dyslexia. **Am J Hum Genet** 78(1):52–62, 2006.
- Schumacher J, Hoffmann P, Schmal C, Schulte-Korne G, Nothen MM. Genetics of dyslexia: the evolving landscape. **J Med Genet** 44(5):289-97, 2007.
- Schumacher J, König IR, Schröder T, Duell M, Plume E, Propping P, et al. Further evidence for a susceptibility locus contributing to reading disability on chromosome 15q15-q21. **Psychiatr Genet** 18(3):137-42, 2008.
- Secolin R, Rocha CS, Torres FR, Santos ML, Maurer-Morelli CV, Santos NF, et al. LINKGEN: a new algorithm to process data in genetic linkage studies. **Genomics** 91:544–547, 2008.
- Shapleske J, Rossell SL, Woodruff PW, David AS. The planum temporale: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. [Review]. **Brain Res Brain Res Rev** 29: 26–49, 1999.
- Shaywitz SE, Shaywitz BA, Fletcher JM, Escobar MD. Prevalence of reading disability in boys and girls. Results of the Connecticut Longitudinal Study. **JAMA** 264 (8):998-1002, 1992.
- Shaywitz BA, Shaywitz SE, Pugh KR, Mencl WE, Fulbright RK, Skudlarski P, Constable RT, Marchione KE, Fletcher JM, Lyon GR, Gore JC. Disruption of posterior brain systems for reading in children with developmental dyslexia. **Biol Psychiatry** 52(2): 101-10, 2002.
- Shaywitz SE, Shaywitz BA. Dyslexia (Specific Reading Disability). **Biological Psychiatry** 57:1301-1309, 2005.
- Shaywitz S, Shaywitz BA. Paying attention to reading: The neurobiology of reading and dyslexia. **Development and Psychopathology** 20:1329–1349, 2008.
- Simos PG, Breier JI, Fletcher JM, et al. Brain activation profiles in dyslexic children during non-word reading: a magnetic source imaging study. **Neurosci Lett** 290(1):61-65, 2000.
- Smith SD, Kimberling WJ, Pennington BF, et al. Specific reading disability: identification of an inherited form through linkage analysis. **Science** 219(4590):1345–1347, 1983.
- Smith SD, Kimberling WJ, Pennington BF. Screening for multiples genes influencing dyslexia. **Read Writ** 3: 285–298, 1991.

- Snowling MJ. Dislexia desenvolvimental: uma introdução e visão teórica geral. Em: M. Snowling & J. Stackhouse. **Dislexia, fala e linguagem**. Porto Alegre: Artmed. 2004.
- Sorensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. **Anal Chem** 1;80(23):9363-8, 2008.
- Spreen O, Risser AH, Edgell D. **Developmental Neuropsychology**. New York, Oxford: Oxford University Press, 1995.
- Spreen O, Strauss E. **A Compendium of Neuropsychological Tests: Administration, Norms and Commentary** (2nd Ed.). New York: Oxford University Press. 1998.
- Stein LM. **Teste de desempenho escolar: manual para aplicação e interpretação**. São Paulo: Casa do psicólogo. 1994.
- Stein J, Walsh V. To see but not to read: the magnocellular theory of dyslexia. **Trends Neurosci** 20: 147–52, 1997. Stein, J.; Talcott, J. Impaired neuronal timing in developmental dyslexia - the magnocelular hypothesis. **Dyslexia** v. 5, p. 59-77, 1999.
- Stein, J. **The neurobiology of reading difficulties**. Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty acids. Edinburgh, v.63, n.1-2, p. 109-116, 2000.
- Strachan T, Read AP. **Hum Mol Genet**. New York: 2002.
- Sun T, Walsh CA. Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. **Nat Rev Neurosci** 7, 655-662, 2006.
- Taipale M, Kaminen N, Nopola-Hemmi J, Haltia T, Myllyluoma B, Lyytinen H, et al. A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. **Proc Natl Acad Sci USA** 100 (20), p. 11553-11558, 2003.
- Tallal P, Allard L, Miller S, Curtiss S. Academic Outcomes of Language Impaired Children, In: **Dyslexia: Biology, Cognition and Intervention**, Hulne C, Snowling M, (Eds), Whurr Press, London, pp. 167-181, 1997.
- Tantoso E, Yang Y, et al. How well do HapMap SNPs capture the untyped SNPs? **BMC Genomics**, v7, p.238, 2006.
- Tapia-Páez I, Tammimies K, Massinen S, Roy AL, Kere J. The complex of TFII-I, PARP1, and SFPQ proteins regulates the DYX1C1 gene implicated in neuronal migration and dyslexia. **FASEB J** 22(8):3001-9, 2008.

- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. **Hum Mutat** 22: 428–433, 2003.
- Temple E, Poldrack RA, Salidis J, et al. Disrupted neural responses to phonological and ortografic processing in dyslexic children: an fMRI study. **Neuroreport** 12(2):299-307, 2001.
- The International Dyslexia Association. Disponível em: <<http://www.interdys.org>> (Último acesso em Jun/2009).
- Tunstall, J. Improving the utility of the Tower of London: A neuropsychological test of planning. Unpublished MPhil thesis. Brisbane, Australia: Griffith University. 1999.
- Tzenova J, Kaplan BJ, Petryshen TL, et al. Confirmation of a dyslexia susceptibility locus on chromosome 1p34–p36 in a set of 100 Canadian families. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 127(1):117–124, 2004.
- Wang Y, Paramasivam M, Thomas A, Bai J, Kaminen-Ahola N, et al. *DYX1C1* functions in neuronal migration in developing neocortex. **Neuroscience**. 143:515–22, 2006.
- Weintraub S, Mesulam MM. Mental state assessment of young and elderly adults in behavioural neurology. In: M.-M. Mesulam, Editor, **Principles of behavioural neurology**, FA Davis Company, Philadelphia, pp. 71–123, 1985.
- Werker JF, Tees RC. Speech perception in severely disabled and average reading children. **Can J Psychol** 41: 48–61, 1987.
- Wigg KG, et al. Support for EKN1 as the susceptibility locus for dyslexia on 15q21. **Mol Psychiatry** 9, 1111–1121, 2004.
- Williams J, O'Donovan MC. The genetics of developmental dyslexia. **Eur J Hum Genet** 14(6):681-9, 2006.
- Yavas M, Hernandorena, CLM Lamprecht, RR. **Avaliação fonológica da criança: reeducação e terapia**. Porto Alegre: Artes Médicas. 148 p, 1992.
- Zhang K, et al. Haplotype block structure and its application to association studies: power and study designs. **Am J Hum Genet**, 71 (6), p. 1386-94, 2002.

**ANEXOS**

---

Nº da Família	Identific. do Indivíduo	rs16787		rs3743205		rs17819126		rs57809907	
		C=1	A=2	C=1	T=2	C=1	T=2	C=1	A=2
1	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
1	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
1	Pai	1	2	1	2	1	1	1	2
2	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
2	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
2	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
3	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
3	Filho 2	1	2	1	1	1	1	1	1
3	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
3	Pai	1	2	1	1	1	1	1	1
4	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	2
4	Filho 2	2	2	1	1	1	1	1	2
4	Filho 3	2	2	1	2	1	1	1	2
4	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
5	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
5	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
5	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
6	Afetado	2	2	1	2	1	1	1	2
6	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	2
6	Pai	1	2	2	2	1	1	1	1
7	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
7	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
7	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
8	Afetado	1	2	1	1	1	2	1	1
8	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	2
9	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
9	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
9	Pai	1	2	1	1	1	2	1	1
10	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
10	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
10	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
11	Afetado	2	2	1	2	1	1	1	1
11	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
11	Pai	2	2	2	2	1	1	1	2
12	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
12	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
13	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
13	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
13	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1



No Família	Identific. do Indivíduo	rs16787		rs3743205		rs17819126		rs57809907	
		C=1	A=2	C=1	T=2	C=1	T=2	C=1	A=2
14	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
14	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
14	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
15	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
15	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
15	Pai	1	2	1	1	1	1	1	2
16	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
16	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
16	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
17	Afetado	2	2	1	1	1	2	1	1
17	Mãe	2	2	1	1	1	2	1	1
17	Pai	1	2	1	1	1	1	1	1
18	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
18	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
18	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
19	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
19	Mãe	2	2	1	2	1	1	1	2
19	Pai	2	2	1	1	1	2	1	1
20	Afetado	1	1	1	1	1	1	1	1
20	Mãe	1	1	1	1	1	1	1	1
21	Afetado	1	2	1	2	1	1	1	2
21	Mãe	2	2	1	2	1	1	1	2
21	Pai	1	1	1	1	1	1	1	1
22	Afetado	1	1	1	1	1	1	1	1
22	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
22	Pai	1	1	1	1	1	1	1	1
23	Afetado	2	2	1	2	1	1	1	2
23	Mãe	2	2	1	2	1	1	1	2
23	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
24	Afetado	2	2	1	2	1	1	1	1
24	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
24	Pai	2	2	1	2	1	1	1	1

No	Identific. do	rs16787	rs3743205	rs17819126	rs57809907
Família	Indivíduo	C=1 A=2	C=1 T=2	C=1 T=2	C=1 A=2
1	Afetado	2 2	1 2	1 1	1 1
1	Mãe	1 2	1 1	1 1	1 1
1	Pai	2 2	1 2	1 1	1 1
1	Filho 2	1 2	1 2	1 1	1 1
2	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
2	Mãe	2 2	1 1	1 1	1 1
2	Filho 2	2 2	1 1	1 1	1 1
3	Afetado	2 2	1 1	1 2	1 2
3	Mãe	2 2	1 1	1 2	1 1
3	Pai	2 2	1 1	1 1	1 2
4	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
4	Mãe	2 2	1 1	1 1	1 1
4	Pai	2 2	1 1	1 1	1 1
5	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
5	Mãe	2 2	1 1	1 1	1 2
5	Pai	1 2	1 1	1 1	1 1
5	Filho 2	1 2	1 1	1 1	1 1
6	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
6	Mãe	1 2	1 1	1 1	1 1
7	Afetado	1 2	1 1	1 1	1 1
7	Pai	2 2	1 2	1 1	1 1
7	Filho 2	2 2	1 1	1 1	1 1
8	Afetado	2 2	1 2	1 1	1 2
8	Pai	1 2	1 1	1 1	1 1
9	Afetado	1 2	1 1	1 1	1 1
9	Mãe	2 2	1 1	1 1	1 1
9	Pai	1 2	1 1	1 1	1 1
10	Afetado	2 2	1 2	1 1	1 2
10	Mãe	2 2	2 2	1 1	2 2
10	Pai	2 2	1 1	1 1	1 1
10	Filho 2	2 2	1 2	1 1	1 2
11	Afetado	1 2	1 1	1 1	1 1
11	Mãe	1 2	1 1	1 1	1 1
12	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
12	Mãe	2 2	1 2	1 1	1 2
12	Pai	2 2	1 1	1 1	1 1
13	Afetado	2 2	1 1	1 1	1 1
13	Mãe	2 2	1 2	1 1	1 2
13	Pai	2 2	1 1	1 1	1 1

No Família	Identific. do Indivíduo	rs16787		rs3743205		rs17819126		rs57809907	
		C=1	A=2	C=1	T=2	C=1	T=2	C=1	A=2
14	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
14	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
14	Pai	1	1	1	1	1	1	1	1
14	Filho 2	1	1	1	1	1	1	1	1
15	Afetado	2	2	1	2	1	1	1	2
15	Mãe	2	2	1	2	1	1	1	2
16	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
16	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
16	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
17	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
17	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
18	Afetado	2	2	1	1	1	2	1	1
18	Mãe	2	2	1	1	1	2	1	1
18	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
19	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
19	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
19	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
19	Filho 2	1	2	1	1	1	1	1	1
20	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
20	Mãe	1	1	1	1	1	1	1	1
20	Pai	2	2	1	1	1	1	1	1
21	Afetado	1	2	1	2	1	1	1	1
21	Mãe	1	2	1	1	1	1	1	1
21	Pai	1	2	1	2	1	1	1	2
21	Filho 2	1	1	1	1	1	1	1	1
22	Afetado	1	2	1	1	1	1	1	1
22	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1
22	Pai	1	2	1	1	1	1	1	1
22	Filho 2	1	2	1	1	1	1	1	1
23	Afetado	1	1	1	2	1	1	1	1
23	Mãe	1	2	1	2	1	1	1	1
23	Pai	1	2	1	1	1	1	1	1
23	Filho 2	2	2	1	2	1	1	1	1
24	Afetado	1	2	1	1	1	2	1	1
24	Mãe	1	2	1	1	1	2	1	1
24	Pai	2	2	1	1	2	2	1	1
25	Afetado	2	2	1	1	1	1	1	1
25	Mãe	2	2	1	1	1	1	1	1



CEP, 22/02/11.  
(PARECER CEP: Nº 105/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

## PARECER

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ASPECTOS GENÉTICOS DA DISLEXIA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fabiana Alexandrino

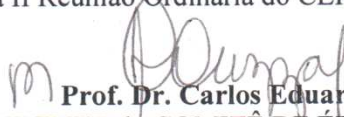
### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto “**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS EM INDIVÍDUOS BRASILEIROS COM DISLEXIA**” com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com finalidade de mestrado da aluna Maria Carolina Costa Melo Svidnicki, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de fevereiro de 2011.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP