

**Vanessa Kiyomi Arashiro Ota**

**ESQUIZOFRENIA E SÍNDROME DA DELEÇÃO 22q11.2:  
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELEVANTES**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências

São Paulo

2011

**Vanessa Kiyomi Arashiro Ota**

**ESQUIZOFRENIA E SÍNDROME DA DELEÇÃO 22q11.2:  
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELEVANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília de Arruda Cardoso Smith

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sítia Iole Nogueira Belangero

São Paulo

2011

Ota, Vanessa Kiyomi Arashiro

**Esquizofrenia e síndrome da deleção 22q11.2: Caracterização de genes relevantes/** Vanessa Kiyomi Arashiro Ota. -- São Paulo, 2011.  
xx, 150 f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Morfologia e Genética.

Título em Inglês: *Schizophrenia and 22q11 deletion syndrome: Characterization of relevant genes.*

1.Esquizofrenia. 2.Síndrome de DiGeorge. 3.Polimorfismo. 4.CNV. 5.Gene.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Programa de Pós-Graduação em Morfologia/Genética**

**Chefe da Disciplina de Genética:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília de Arruda Cardoso Smith

**Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sima Godosevicius

**Coordenador do Curso de Pós-graduação em Morfologia e Genética:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete Maria Cerutti

**Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina**

**Reitor:** Prof. Dr. Walter Manna Albertoni

**Vice-reitor:** Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

**Chefe de Gabinete:** Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

**Este estudo foi desenvolvido nos seguintes locais:**

Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia e Genética – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Programa de Esquizofrenia (PROESQ) – Departamento de Psiquiatria – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

**Auxílio financeiro:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo: 2008/56464-7

**ORIENTADORA:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília de Arruda Cardoso Smith**

Professora Titular

Disciplina de Genética

Departamento de Morfologia e Genética

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

**CO-ORIENTADORA:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SÍntia Iole Nogueira Belangero**

Professora Adjunta

Disciplina de Genética

Departamento de Morfologia e Genética

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

## **COLABORADORES:**

### **Disciplina de Genética - Departamento de Morfologia e Genética Universidade Federal de São Paulo**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

Dr<sup>a</sup>. Denise Maria Christofolini

MS Fernanda Teixeira da Silva Bellucco

MS. Ade Núbia Xavier Pacanaro

Bach. Marcos Leite Santoro

### **Disciplina de Biologia do Desenvolvimento - Departamento de Morfologia e Genética**

#### **Universidade Federal de São Paulo**

Dr<sup>a</sup>. Mirlene Cecília Soares Pinho Cernach

### **Departamento de Psiquiatria - Universidade Federal de São Paulo**

Prof. Dr. Jair de Jesus Mari

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Parolin Jackowski

Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan

Dr. Ary Gadelha de Alencar Araripe Neto

MS Arthur de Almeida Berberian

### **Disciplina de Cardiologia - Departamento de Medicina**

#### **Universidade Federal de São Paulo**

Prof. Dr. Antonio Carlos Carvalho

### **Departamento de Psicobiologia**

#### **Universidade Federal de São Paulo**

MS Renata Pellegrino da Silva

### **Instituto da Criança**

#### **Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

Dr<sup>a</sup>. Chong Ae Kim

### **Setor de Neurogenética e Neurofisiologia**

#### **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto**

Dr. Charles Marques Lourenço

### **Laboratório de Genética Humana e Médica**

#### **Universidade Federal do Pará**

Dr. Sidney Emanuel Santos

Dr<sup>a</sup>. Ândrea Kely Campos Ribeiro-dos-Santos

### **Faculdade de Biociências**

#### **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara

**Vanessa Kiyomi Arashiro Ota**

**ESQUIZOFRENIA E SÍNDROME DA DELEÇÃO 22q11.2:  
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELEVANTES**

**Presidente da banca:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília de Arruda Cardoso Smith

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_



*Dedico esse trabalho à minha família e meus amigos, pois cada um contribuiu para o meu crescimento e me ajudou a superar mais um desafio.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília de Arruda Cardoso Smith**, por ter me oferecido um segundo lar e ter sido minha professora por esses seis anos que se passaram.

Ao **meu pai**, à **minha mãe**, aos meus irmãos, **Valéria, Jorginho e Vivi**, por todo o amor, carinho, compreensão e por terem se esforçado tanto durante todos esses anos.

À **minha família**: avós, tios e primos, por terem me acolhido durante toda a minha vida, pelas risadas e carinho.

Ao **Shindi**, por ter me incentivado e ajudado a crescer. Obrigada por tudo, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e me dado razão para continuar. Por nunca ter desistido e nem ter me deixado desistir dos nossos sonhos.

Às amigas e aos amigos da Genética: **Tuty, Diego, Fê Wis, Pat, Tatinha, Ana, Mari, Stella, Carol, Betty, Thaís, Léo, Ianna, Dani, Núbia, Roberta, Fê Bellucco, Marquinhos, Si, Deni, Renata**; e aos mais novos integrantes: **Belisa, Letícia, Vinícius, Mari Moysés**; por todos os momentos compartilhados, tanto bons quanto difíceis; por terem me ensinado muito mais do que genética e por fazerem parte da minha vida.

Às funcionárias da Genética, **Sylvinha, Cleide, Regina e Mara**, pela companhia e apoio.

Às professoras **Dra. Maria Isabel Melaragno, Dra. Gianna Carvalheira e Dra. Janete Cerutti** pela amizade e contribuição na formação acadêmica.

À minha querida amiga e co-orientadora, **Sintia**, por todos os ensinamentos desde genética à vida. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelos conselhos sinceros, que me incentivaram a continuar nessa jornada.

Aos meus eternos amigos, **Tuty** e **Diego**, por todo o apoio e por terem me dado a honra de ser madrinha do casamento de vocês. Vocês foram responsáveis por grande parte da minha mudança. Conseguimos realizar muitas conquistas juntos e fico extremamente feliz pelos caminhos que vocês estão traçando.

Ao grupo da Psiquiatria, em especial ao **Ary, Arthur, Aírton, Idaiane, Dr Rodrigo Bressan, Dra. Andréa Jackowski e Dr. Jair Mari**, pela confiança e por terem contribuído imensamente para o trabalho.

À **Renata**, por ter contribuído imensamente para a minha tese e pelas risadas. Ao **Dr. Sérgio Tufik** e **Dr<sup>a</sup> Camila Guindalini** por terem aberto as portas para nós.

Aos companheiros de jornada do grupo de esquizofrenia, **Si, Marquinhos, Fê Bellucco, Deni, Vinícius, Letícia**, pela companhia nos mutirões de domingo, pelo apoio e cumplicidade.

Às minhas queridas irmãs da faculdade, **Pri, Ro, Jú, Tuty e Mari**, que me ajudaram nos momentos difíceis, e que admiro tanto.

Aos grandes amigos, **Kenji, Hitomi, Sica, Michel, Kazuo e Key**, por toda a amizade e que, mesmo longe, contribuíram muito para a minha vida.

Ao pessoal do **CUJA**, membros e alunos, que me ofereceram a oportunidade de mudar, ter responsabilidade e maturidade.

Aos colaboradores do projeto, **Dr<sup>a</sup>. Mirlene Cernach, Dr<sup>a</sup>. Chong Kim, Dr. Charles Lourenço, Dr. Sidney Santos, Dr<sup>a</sup>. Ândrea Ribeiro-dos-Santos e Dr. Diogo Lara**, pelo fornecimento e processamento de amostras.

À **banca**, por ter aceitado avaliar a minha dissertação.

À **todos** que contribuíram tanto para a minha formação pessoal quanto profissional e **àqueles** que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	viii
AGRADECIMENTOS.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
LISTAS.....	xiv
RESUMO.....	xx
1 INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Objetivos .....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1 Esquizofrenia .....	5
2.1.1 Modelo do neurodesenvolvimento da esquizofrenia.....	6
2.1.2 Outros modelos de desenvolvimento da esquizofrenia .....	7
2.2 Modelo de neurodegeneração .....	7
2.3 Modelo da via dopaminérgica .....	8
2.4 Modelo da via glutamatérgica .....	8
2.5 Modelo da via GABAérgica .....	9
2.6 Modelo da via serotoninérgica .....	9
2.6.1 Esquizofrenia e neuroimagem .....	10
2.6.2 Esquizofrenia e neuropsicologia .....	11
2.6.3 Bases genéticas da esquizofrenia .....	12
2.6.4 Fatores de risco ambientais para a esquizofrenia .....	13
2.6.4.1 <i>Copy Number Variation</i> (CNV) e esquizofrenia .....	13
2.7 Síndrome da deleção 22q11.2 (22q11DS).....	15
2.8 Síndrome da deleção 22q11.2 e esquizofrenia .....	17
2.8.1 O gene <i>UFD1L</i> na patogênese da 22q11DS e na esquizofrenia.....	18
2.8.2 O gene <i>ZDHHC8</i> na patogênese da esquizofrenia.....	21
2.8.3 O gene <i>TBX1</i> na patogênese da 22q11DS .....	22
3 MÉTODOS .....	27
3.1 Casuística .....	27
3.2 Avaliação psiquiátrica.....	29
3.2.1 Pacientes portadores de esquizofrenia.....	29
3.2.2 Indivíduos controles.....	31
3.3 Avaliação genético-clínica.....	31
3.4 Avaliação cardíaca .....	32
3.5 Avaliação neuropsicológica.....	34
3.6 Avaliação neuroestrutural.....	35
3.7 Avaliação genética .....	37
3.7.1 Estudo citogenético .....	37
3.7.1.1 Coleta de sangue e cultura de linfócitos.....	37
3.7.1.2 Coloração cromossômica por bandamento G .....	38
3.7.1.3 Técnica de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) .....	38
3.7.1.4 Análise citogenética.....	38
3.7.2 Estudo molecular .....	39
3.7.2.1 Extração e armazenamento de DNA .....	39
3.7.2.2 Análise de ancestralidade .....	40
3.7.2.3 Estudo molecular por meio da técnica de MLPA.....	41
3.7.2.4 Determinação dos genótipos do gene <i>UFD1L</i> .....	43
3.7.2.5 Determinação dos genótipos do gene <i>ZDHHC8</i> .....	47
3.7.2.6 Sequenciamento do gene <i>TBX1</i> .....	48

3.8	Análise de CNVs pela metodologia de array .....	53
3.8.1	Fluxo experimental do <i>GeneChip array 6.0 Affymetrix</i> .....	54
3.8.2	Análise dos Dados .....	56
3.8.3	Qualidade das análises .....	59
3.9	Análise estatística .....	60
4	RESULTADOS .....	62
4.1	Caracterização da casuística .....	62
4.2	Avaliação genético-clínica .....	62
4.3	Análise genética .....	63
4.3.1	Análise citogenética .....	63
4.3.2	Análise molecular da deleção 22q11.2 por meio da técnica de MLPA .....	64
4.3.3	Análise da deleção 22q11.2 por meio da técnica de FISH .....	66
4.3.4	Avaliação genético-clínica do paciente portador da deleção 22q11.2 .....	67
4.3.5	Gene <i>UFD1L</i> .....	67
4.3.5.1	Análise de haplótipos do gene <i>UFD1L</i> .....	68
4.3.5.2	Gene <i>UFD1L</i> e idade de acometimento .....	69
4.3.5.3	Gene <i>UFD1L</i> e refratariedade ao tratamento com antipsicóticos .....	71
4.3.5.4	Gene <i>UFD1L</i> e neuropsicologia .....	72
4.3.5.5	Gene <i>UFD1L</i> e neuroimagem .....	73
4.3.6	Gene <i>ZDHHC8</i> .....	73
4.3.6.1	Gene <i>ZDHHC8</i> e idade de acometimento .....	74
4.3.6.2	Gene <i>ZDHHC8</i> e refratariedade ao tratamento com antipsicóticos .....	75
4.3.6.3	Gene <i>ZDHHC8</i> e neuropsicologia .....	76
4.3.6.4	Gene <i>ZDHHC8</i> e neuroimagem .....	76
4.3.7	Interação entre os genes <i>UFD1L</i> e <i>ZDHHC8</i> .....	78
4.3.8	Gene <i>TBX1</i> e a síndrome 22q11DS .....	79
4.3.9	Análise de CNVs .....	79
5	DISCUSSÃO .....	83
5.1	Avaliação citogenética em pacientes portadores de esquizofrenia .....	83
5.2	Fenótipo da 22q11DS em pacientes portadores de esquizofrenia .....	86
5.3	Investigação da deleção 22q11.2 por meio de MLPA em pacientes portadores de esquizofrenia .....	88
5.4	Gene <i>UFD1L</i> e esquizofrenia .....	91
5.4.1	Associação de polimorfismos e haplótipos do gene <i>UFD1L</i> com a esquizofrenia .....	91
5.4.2	Gene <i>UFD1L</i> e a idade de acometimento da esquizofrenia .....	94
5.4.3	Gene <i>UFD1L</i> e refratariedade ao tratamento com antipsicóticos .....	95
5.4.4	Gene <i>UFD1L</i> e neuropsicologia .....	96
5.4.5	Gene <i>UFD1L</i> e neuroimagem .....	97
5.5	Gene <i>ZDHHC8</i> e esquizofrenia .....	99
5.5.1	Associação do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> com a esquizofrenia .....	99
5.5.2	Gene <i>ZDHHC8</i> e idade de acometimento da esquizofrenia .....	101
5.5.3	Gene <i>ZDHHC8</i> e refratariedade .....	102
5.5.4	Gene <i>ZDHHC8</i> e neuropsicologia .....	102
5.5.5	Gene <i>ZDHHC8</i> e neuroimagem .....	102
5.6	Interação entre os genes <i>UFD1L</i> e <i>ZDHHC8</i> .....	103
5.7	Gene <i>TBX1</i> e a síndrome 22q11DS .....	105
5.8	Análise de CNVs .....	106
6	CONCLUSÕES .....	110

7	ANEXOS .....	113
7.1	Anexo I – Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP (Processo 1737/06).....	113
7.2	Anexo II – Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP (Processo 1076/07).....	114
7.3	Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	116
7.4	Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	118
7.5	Anexo V – Ficha clínica para investigação.....	120
7.6	Anexo VI – SALSA MLPA KIT P250 DiGeorge probemix/MRC-Holland .....	124
7.7	Anexo VI – Artigo Publicado na Journal of Psychiatry Research .....	125
8	REFERÊNCIAS.....	129
9	ABSTRACT .....	152
10	APÊNDICES.....	153
10.1	Apêndice I – Artigo submetido ao periódico Schizophrenia Research .....	153
10.2	Apêndice II – Artigo em preparo.....	154
10.3	Apêndice III - Artigo publicado no período do Mestrado.....	155
10.4	Apêndice IV - Artigo publicado no período do Mestrado .....	156

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mapa do <i>locus</i> 22q11.2.....	16
<b>Figura 2.</b>	Estrutura genômica do gene <i>UFD1L</i> e a posição dos 3 polimorfismos investigados: rs5992403 (no promotor), rs5746744 e rs1547931 (ambos no íntron 3).....	19
<b>Figura 3.</b>	Estrutura genômica do gene <i>TBX1</i> .....	23
<b>Figura 4.</b>	Desenho esquemático representando as avaliações a que foram submetidos cada grupo.....	29
<b>Figura 5.</b>	Etapas da metodologia de MLPA.....	42
<b>Figura 6.</b>	Gráficos obtidos com a PCR em Tempo Real com sistema <i>TaqMan</i> .....	44
<b>Figura 7.</b>	Gel de agarose 3% após a digestão com a enzima <i>MvaI</i> para o polimorfismo rs5746744.....	46
<b>Figura 8.</b>	Gel de agarose 3% após a digestão com a enzima <i>PstI</i> para o polimorfismo rs1547931.....	47
<b>Figura 9.</b>	Eletroferograma do sequenciamento do éxon 4 do gene <i>TBX1</i> , indicando a presença de heterozigose.....	53
<b>Figura 10.</b>	Esquema representativo das etapas envolvidas nos experimentos de array <i>Genome-wide 6.0 Affymetrix</i> .....	55
<b>Figura 11.</b>	a) Gel de agarose 2% após a digestão com as enzimas <i>StyI</i> e <i>NspI</i> , ligação dos adaptadores e a amplificação do DNA, mostrando um padrão de bandas de 200pb a 1100pb. b) Gel de agarose 3% após a digestão com <i>DNaseI</i> , mostrando um padrão de bandas de 50pb a 200pb.....	55
<b>Figura 12.</b>	Esquema da análise de arrays.....	58
<b>Figura 13.</b>	Imagem gerada após "leitura" do chip 6.0 utilizando o software <i>Partek Suite</i> .....	59

<b>Figura 14.</b>	Resultado normal da MLPA obtido por meio do software <i>GeneMarker</i> de um dos pacientes (T159) sem alteração no número de cópias para todas as regiões estudadas.....	64
<b>Figura 15.</b>	Resultado da MLPA obtido por meio do software <i>GeneMarker</i> do paciente (T158) portador da deleção de 1,5Mb em 22q11.2.....	65
<b>Figura 16.</b>	a) Esquema das sondas utilizadas para o estudo do cromossomo 22 e b) metáfase provenientes de cultura de linfócitos mostrando a presença de uma cópia da região 22q11.2 (sinal vermelho), indicado pela seta e a presença de duas cópias (uma em cada cromossomo 22) da região controle mapeada em 22q13.33 (sinal verde).....	66
<b>Figura 17.</b>	Esquema de desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> .....	69
<b>Figura 18.</b>	Gráfico representando nas ordenadas os valores de idade de acometimento padronizadas com Z score e nas abscissas os genótipos do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> e nas linhas os do polimorfismo rs5992403 do gene <i>UFD1L</i> .....	78
<b>Figura 19.</b>	Representação das regiões cromossômicas encontradas amplificadas (1p36.32, 2q37.3 e 22q11.21, respectivamente). Os genes envolvidos estão indicados. Figura adaptada a partir dos resultados gerados pelo UCSC Genome Browser (NCBI26/hg18).....	80



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Caracterização da amostra de pacientes com esquizofrenia e indivíduos controle.....	28
<b>Tabela 2.</b>	Primers utilizados para a amplificação de éxons do gene <i>TBX1</i> e os tamanhos dos fragmentos amplificados.....	48
<b>Tabela 3.</b>	Descrição clínica do fenótipo dos portadores de esquizofrenia.....	63
<b>Tabela 4.</b>	Resumo dos resultados de análise citogenética dos pacientes com esquizofrenia.....	63
<b>Tabela 5.</b>	Frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> e associação dos genótipos com esquizofrenia por meio da análise de regressão logística.....	68
<b>Tabela 6.</b>	Frequências dos haplótipos total, no grupo de casos e no de controles e resultados dos testes de qui-quadrado para os haplótipos dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> .....	69
<b>Tabela 7.</b>	Médias e desvios padrão das idades de acometimento da esquizofrenia para cada genótipo dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> , e resultados do teste de Kruskal-Wallis associando os genótipos com a idade de acometimento.....	70
<b>Tabela 8.</b>	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> quanto aos grupos separados por idade de acometimento da esquizofrenia (Grupo I: < 18 anos e Grupo II: ≥ 18 anos) e resultados da análise de regressão logística.....	70
<b>Tabela 9.</b>	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> quanto aos grupos de refratário e não refratário e resultados da análise de regressão logística.....	71
<b>Tabela 10.</b>	Resultados da ANCOVA, com idade, escolaridade e quociente de inteligência como covariáveis, apresentando as variáveis neuropsicológicas em associação com os genótipos dos polimorfismos do gene <i>UFD1L</i> .....	72
<b>Tabela 11.</b>	Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> e associação dele com esquizofrenia por meio da análise de regressão logística.....	74
<b>Tabela 12.</b>	Médias e desvios padrão das idades de acometimento da esquizofrenia para cada genótipo do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> , e resultados do teste de Kruskal-Wallis associando os genótipos com a idade de acometimento.....	74

<b>Tabela 13.</b>	Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> quanto aos grupos separados por idade de acometimento da esquizofrenia (Grupo I: < 18 anos e Grupo II: > 18 anos) e resultados da análise de regressão logística.....	75
<b>Tabela 14.</b>	Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> quanto aos grupos de refratário e não-refratário e resultados da análise de regressão logística.....	75
<b>Tabela 15.</b>	Resultados da análise de <i>General Linear Model</i> , apresentando as variáveis neuropsicológicas em associação com os genótipos do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> . Médias ajustadas para idade, escolaridade e quociente de inteligência.....	76
<b>Tabela 16.</b>	Resultados da análise de neuroimagem quanto ao polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> .....	77
<b>Tabela 17.</b>	Polimorfismos encontrados nos éxons 2, 4,7 e 9A do gene <i>TBX1</i> e suas frequências.....	79
<b>Tabela 18.</b>	Regiões cromossômicas amplificadas nos pools de DNA de pacientes de São Paulo (SP e SP REP), em pelo menos um pool subdividido (SP REP-A, SP REP-B, SP REP-C) e no do Rio Grande do Sul e por meio das três análises.....	80
<b>Tabela 19.</b>	Frequências do alelo G do polimorfismo rs175174 do gene <i>ZDHHC8</i> em diferentes populações de pacientes com esquizofrenia e controles.....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

22q11DS	Síndrome da deleção 22q11.2
5-HT2	Receptor de serotonina <i>5-hydroxytryptamine 2</i>
5-HTR2A	Receptor de serotonina <i>5-hydroxytryptamine 2</i> subtipo A
A	Adenina
ANCOVA	Análise de covariância
APOA-IV	Apolipoproteína A-IV
ASI	<i>Addiction Severity Index</i>
BAC	Cromossomo artificial de bactéria
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
C	Citosina
CDC45L	<i>Cell division Cycle 45 homolog (S. cerevisiae)-Like</i>
CNV	Varição no número de cópias
COMT	Catecol-O-metil transferase
CQ	Controle de qualidade
DGCR2	<i>DiGeorge syndrome critical region 2</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DGS	Síndrome de DiGeorge
dHAND	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 2</i>
DICE	Distâncias intercantais externas
DICI	Distâncias intercantais internas
DISC1	<i>Disrupted-in Schizophrenia 1</i>
DISC2	<i>Disrupted-in-Schizophrenia 2</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i>
DTNBP1	<i>Dystrobrevin-binding protein 1</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAM	<i>6-carboxy-fluorescein</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
G	Guanina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD1	Glutamato descarboxilase 1
gl	Graus de liberdade
GLM	<i>General Linear Model</i> (Modelo Linear Geral)
GNB1L	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1 - like</i>
GRIA1	<i>Glutamate receptor ionotropic, AMPA 1</i>
GRIN1	<i>Glutamate (NMDA) receptor subunit zeta 1</i>
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>

HTR3A	<i>5-hydroxytryptamine receptor 3A</i>
HVLT-R	<i>Hopkins Verbal Learning Test Revised</i>
LCR	<i>Low copy repeats</i>
LDA	<i>Linkage Disequilibrium Analyzer</i>
LSD	<i>Lysergic acid diethylamide</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NRG1	<i>Neuroregulin 1</i>
NSD1	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRODH	Prolina desidrogenase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucéico mensageiro
SAPE	<i>Streptavidin-phycoerytrin</i>
SCID-I	Entrevista clínica estruturada para o DSM-IV
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPM	<i>Statistical Parametric Mapping</i>
T	Timina
TBX1	T-Box 1
TDT	<i>Transmission disequilibrium test</i>
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>
UFD1L	<i>Ubiquitin Fusion Degradation 1-like</i>
VBM	Voxel-based morphometry
VCFS	Síndrome velocardiofacial
WHOQOL BREF	Escala abreviada de Qualidade de Vida da Organização Mundial de Saúde
WCST	<i>Wisconsin Card Sorting Test</i>
ZDHHC8	<i>Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8</i>
♀	Sexo feminino
♂	Sexo masculino

## RESUMO

**Introdução:** A esquizofrenia é o transtorno mental mais grave e incapacitante entre os distúrbios psiquiátricos. Ela é uma doença complexa e com fenótipo heterogêneo. Dentre os fatores genéticos que parecem ter um papel na etiologia da esquizofrenia está a deleção 22q11.2. **Objetivos:** Investigar alterações cromossômicas, polimorfismos dos genes *UFD1L* e *ZDHHC8*, mutações no gene *TBX1* e variações no número de cópias na esquizofrenia e na síndrome da deleção 22q11.2, e correlacionar com achados de avaliações genético-clínicas, psiquiátricas, neuropsicológicas e de neuroimagem. **Métodos:** Um total de 200 portadores de esquizofrenia, 200 indivíduos controles e 10 portadores do fenótipo clínico da síndrome da deleção 22q11.2, mas sem a deleção, participaram do presente estudo. Os pacientes com esquizofrenia foram estudados por citogenética clássica e *Multiplex Ligation-dependent probe amplification*. Os polimorfismos rs5992403 (gene *UFD1L*) e rs175174 (gene *ZDHHC8*) foram investigados em pacientes com esquizofrenia e controles por meio de PCR em tempo real com sonda TaqMan. Outros polimorfismos do gene *UFD1L* foram analisados, rs5746744 e rs1547931, por *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Mutações no gene *TBX1* foram investigadas em portadores do fenótipo clínico da síndrome da deleção 22q11.2, mas sem a deleção, por meio de sequenciamento genômico. As variações no número de cópias foram analisadas por meio da metodologia de *array* em *pools*. Os pacientes com esquizofrenia também foram avaliados por testes neuropsicológicos e por neuroimagem estrutural. **Resultados:** Todos os cariótipos estudados foram normais. Foi encontrada um paciente com a deleção de 1,5 megabases na região 22q11.2. Os polimorfismos rs5992403 (*UFD1L*) e rs175174 (*ZDHHC8*) foram associados com a idade de acometimento da esquizofrenia. Além disso, todos os polimorfismos investigados parecem desempenhar um papel na morfologia cerebral e em habilidades cognitivas. Nenhuma mutação foi encontrada no gene *TBX1*, apenas polimorfismos, em portadores do fenótipo clínico da 22q11DS. Foram encontradas três regiões amplificadas em *pools* de DNAs de portadores de esquizofrenia: 1p36.32, 2q37.3 e 22q11.21. **Conclusões:** O estudo permitiu avaliar a participação de fatores genéticos em determinadas características da esquizofrenia, propiciando um melhor entendimento sobre a etiologia e fisiopatologia dessa doença complexa.



## 1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia compreende um conjunto de sinais e sintomas de origem desconhecida. Dentre os sintomas que compõem a doença estão as alucinações e delírios, que compõem o quadro de sintomas positivos, o embotamento afetivo, alogia e avolição, que representam os sintomas negativos, e sintomas cognitivos como déficit de atenção, de memória e de funções executivas (Ibrahim, Tamminga, 2010). Os indivíduos geralmente são acometidos no auge do seu potencial produtivo e o curso costuma ser crônico e debilitante. A esquizofrenia segue um modelo de herança multifatorial e apresenta uma herdabilidade de 83%, uma das mais altas dentre os transtornos psiquiátricos (Cannon et al, 1998).

A síndrome da deleção 22q11.2 (22q11DS) é causada por uma microdeleção no cromossomo 22 e apresenta uma incidência de 1 em 2.000-4.000 nascidos vivos (Goldmuntz, 2005). O fenótipo dessa doença é altamente variável e pode afetar múltiplos órgãos e tecidos. Dentre as manifestações clínicas comuns podem ser encontradas: anomalias craniofaciais e cardiovasculares, imunodeficiência, defeitos velofaríngeos, baixa estatura, hipocalcemia, e atraso no neurodesenvolvimento (McDonald-McGinn et al, 1999). Indivíduos com a 22q11DS apresentam déficits cognitivos e comportamentais e um grande risco de desenvolver transtornos psiquiátricos, especialmente a esquizofrenia (Karayiorgou et al, 2010). A maioria dos portadores do fenótipo clínico da 22q11DS apresentam uma microdeleção de 1,5 megabases (Mb) ou de 3 Mb (Karayiorgou et al, 2010) e ainda foram identificadas mutações no gene *TBX1* (*T-Box 1* - OMIM #602054) em portadores do fenótipo, mas não da microdeleção, demonstrando a importância desse gene na síndrome (Zweier et al, 2007).

Através de estudos epidemiológicos, foi estimado que o risco de desenvolver esquizofrenia para um portador da microdeleção 22q11.2 é de aproximadamente 25-31 vezes maior do que o da população em geral (0,3-1,6%) (Bassett et al, 2000). Além disso, a frequência dessa microdeleção em portadores de esquizofrenia pode ser de 12-80 vezes maior que o da população em geral (0,016%) (Karayiorgou, Gogos, 2004). Em adição, diversos estudos moleculares vêm demonstrando uma

associação de genes presentes nessa região com a esquizofrenia e seus endofenótipos (Shifman et al, 2002; Shifman et al, 2006; Shin et al, 2010). Dentre eles estão inclusos os genes *UFD1L* (*Ubiquitin Fusion Degradation 1-like* - OMIM #601754) e *ZDHHC8 C8* (*Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8* - OMIM #608784), que parecem ter um papel importante no neurodesenvolvimento e na esquizofrenia (De Luca et al, 2001; Mukai et al, 2004; Xie et al, 2008; Ota et al, 2010).

## 1.1 Objetivos

O presente trabalho integra um projeto de pesquisa mais amplo que teve como objetivo geral a avaliação de pacientes com esquizofrenia e/ou fenótipo típico da 22q11DS, por meio de um estudo genético-clínico, psiquiátrico, neuropsicológico, neuroestrutural, cromossômico e molecular.

### Objetivos Específicos:

1. Avaliar três polimorfismos do gene *UFD1L* (rs5992403, rs5746744 e rs1547931) e seus haplótipos quanto à associação com a esquizofrenia, com a idade de acometimento desta, refratariedade ao tratamento, habilidades cognitivas e neuroimagem;
2. Avaliar um polimorfismo do gene *ZDHHC8* (rs175174) quanto à associação com a esquizofrenia, com a idade de acometimento desta, refratariedade ao tratamento, habilidades cognitivas e neuroimagem;
3. Investigar mutações em éxons do gene *TBX1* em uma amostra de pacientes portadores do fenótipo clínico da 22q11DS, mas sem a deleção;
4. Investigar a associação entre CNVs (*Copy Number Variations*) e esquizofrenia.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença multifatorial que compreende um conjunto de sinais e sintomas de origem desconhecida. Essa doença apresenta uma incidência média de casos novos em torno de 1,5 por 10.000 habitantes (McGrath et al, 2004) e uma prevalência entre 0,3 a 1,6% na população (Kessler et al, 2005).

Dentre os sintomas que compõem a doença estão as alucinações e delírios, que compõem o quadro de sintomas positivos, o embotamento afetivo, alogia e avolição, que representam os sintomas negativos, e sintomas cognitivos como déficit de atenção, de memória e de funções executivas (Ibrahim, Tamminga, 2010).

Os indivíduos geralmente são acometidos no auge do seu potencial produtivo e o curso costuma ser crônico e debilitante. Em adição, a literatura demonstra forte comorbidade entre a esquizofrenia e o abuso de substâncias (principalmente álcool, nicotina, *cannabis* e cocaína) e algumas condições médicas importantes (obesidade e diabetes tipo 2) (Jeste et al, 1996). A taxa de mortalidade da esquizofrenia é de 2 a 3 vezes mais alta que a da população em geral (McGrath et al, 2008), sendo que desta, 28% é atribuível a suicídio e 12% a acidentes (Brown, 1997).

Segundo dados da organização mundial da saúde, a esquizofrenia é a 8ª principal causa de anos perdidos de vida saudável (Mathers et al, 2006). Dentre os transtornos mentais, a esquizofrenia representa o principal custo direto de tratamento, com cerca de 1,3 a 2,5% do total de gastos em saúde em países ocidentais (Rossler et al, 2005). Em 2002, os custos totais da doença nos Estados Unidos foram estimados em U\$62,7 bilhões (Wu et al, 2005). Em 1998, no estado de São Paulo, o custo direto total da esquizofrenia foi de R\$222 milhões, o que equivale a 2,2% do total de gastos em saúde do Estado (Leitao et al, 2006).

Em 1952, Delay e Deniker demonstraram que a clorpromazina era efetiva para o tratamento da esquizofrenia, descobrindo a primeira medicação efetiva no controle da doença (Rosenbloom, 2002). Desde então, foram mais de 50 antipsicóticos desenvolvidos, cada um exercendo uma ação terapêutica no receptor de dopamina D2 (Carpenter, Koenig, 2008). Atualmente, os antipsicóticos são divididos em duas classes: típicos e atípicos. Uma metanálise demonstrou que as duas classes são semelhantes em relação à eficácia no controle de sintomas positivos e negativos, mas diferem em relação à propensão de desencadear sintomas extrapiramidais (Leucht et al, 1999). Os antipsicóticos atípicos apresentam menor chance de induzir esses sintomas (Kapur, Seeman, 2001).

Mecanismos genéticos e não-genéticos se interagem, levando a uma alteração no desenvolvimento cerebral, resultando em uma predisposição para a esquizofrenia (Schmidt-Kastner et al, 2006). Atualmente existem duas hipóteses principais, não excludentes, para o desenvolvimento da esquizofrenia: a hipótese do neurodesenvolvimento (Lieberman, 1999; Tsuang, 2000; Lewis, Levitt, 2002; Murray et al, 2004) e a da neurodegeneração (Ashe et al, 2001; Church et al, 2002; Sawa, Snyder, 2002).

### **2.1.1 Modelo do neurodesenvolvimento da esquizofrenia**

O modelo do neurodesenvolvimento despontou há duas décadas como uma hipótese que poderia explicar a etiologia da esquizofrenia. Nela é proposto que a doença é resultado de um processo de neurodesenvolvimento alterado que antecede o acometimento de sintomas clínicos e é causado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Essas alterações podem predispor a ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou início da vida adulta, levando à emergência de sintomas positivos, negativos ou ambos (Brown et al, 2004).

Em 1992, Murray et al propuseram a classificação da esquizofrenia em três tipos, de acordo com o aparecimento dos primeiros sintomas: esquizofrenia congênita, esquizofrenia na idade adulta e esquizofrenia de início tardio (Murray et al,

1992). O subtipo de esquizofrenia congênita se aplicaria aos indivíduos que apresentariam alterações cerebrais desde os períodos pré e perinatais, que se manifestariam como distúrbios do comportamento na adolescência (Lewis, Levitt, 2002). Comparado com os demais subtipos de esquizofrenia, a esquizofrenia congênita parece ser mais comum em homens e mais grave (Pilowsky et al, 1993).

Favorecendo o modelo de neurodesenvolvimento, foram encontradas diversas alterações congênitas na esquizofrenia, como a agenesia de corpo caloso, estenose do aqueduto de Sylvius, orelhas de baixa implantação e dermatóglifos anormais (Bracha et al, 1992; Lloyd et al, 2008; Fatemi, Folsom, 2009). Além disso, foram reportados sinais neurológicos pré-mórbidos em crianças que posteriormente desenvolveram esquizofrenia (Fish et al, 1992). Quanto aos fatores ambientais, foi evidenciada uma alta frequência de complicações obstétricas e perinatais em portadores de esquizofrenia (Fatemi, Folsom, 2009), bem como uma exposição materna à infecção (Wright et al, 1995). Diversos genes envolvidos com desenvolvimento cerebral, migração e crescimento celular também já foram associados à esquizofrenia (Walsh et al, 2008).

### **2.1.2 Outros modelos de desenvolvimento da esquizofrenia**

Em adição ao modelo do neurodesenvolvimento, existem outros modelos alternativos que poderiam explicar a etiologia da esquizofrenia. É possível que, devido à natureza heterogênea da doença, múltiplos fatores se interajam para produzir uma doença, como disfunções nos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico, assim como alterações neurodegenerativas (Fatemi, Folsom, 2009).

## **2.2 Modelo de neurodegeneração**

Estudos longitudinais demonstraram um aumento no volume ventricular em um período de 2 a 4 anos entre pacientes em primeiro episódio psicótico

(DeLisi et al, 1997; Nair et al, 1997). Além disso, uma redução no volume do lobo frontal e no volume de substância cinzenta temporal superior posterior após um período de 4 anos foi relatado em pacientes com esquizofrenia crônica (Mathalon et al, 2001). Jarskog et al relataram uma redução na expressão de Bcl-2, uma molécula que protege contra a apoptose, no cérebro de pacientes com esquizofrenia (Jarskog et al, 2005). A vulnerabilidade dos neurônios a alterações pró-apoptóticas poderia levar a perdas sinápticas e dendríticas observadas na esquizofrenia (Mathalon et al, 2001; Sweet et al, 2009).

### **2.3 Modelo da via dopaminérgica**

Grande parte dos estudos envolvendo a neurobiologia da síndrome psicótica tem focado em alterações nos sistemas de neurotransmissores. Dentre elas, a hipótese dopaminérgica, particularmente, é a mais estudada e originou-se a partir de observações que correlacionaram a potência de drogas antipsicóticas com suas afinidades por receptores de dopamina D2 (Seeman, 1987) e que relataram efeitos psicomiméticos de agonistas de dopamina, como a anfetamina (Kapur, Seeman, 2001). A sua versão atual postula que um risco genético interage com um risco ambiental durante o desenvolvimento, levando a um aumento dos níveis de dopamina estriatal pré-sináptica e causando delírios e alucinações (Howes, Kapur, 2009).

### **2.4 Modelo da via glutamatérgica**

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso, com uma função crítica na plasticidade sináptica. Antagonistas de receptores glutamatérgicos, como a fenciclidina e a ketamina, podem causar sintomas psicóticos em indivíduos saudáveis e piorar os dos portadores de esquizofrenia, mostrando seu envolvimento na neurobiologia da doença (Mill et al, 2008). Em adição, estudos *post mortem* identificaram alterações na densidade de receptores glutamatérgicos, no córtex pré-frontal, tálamo e lobo temporal (Gao et al, 2000; Ibrahim

et al, 2000; Meador-Woodruff, Healy, 2000). Genes envolvidos nessa via, como o *GRIN1* e *GRIA1*, têm sido associados à fisiopatologia da esquizofrenia (Sklar et al, 2004; Zhao et al, 2006).

## **2.5 Modelo da via GABAérgica**

Diversos estudos de neurociência básica e clínica sugerem uma função do ácido gamma-aminobutírico (GABA) na patogênese da esquizofrenia (Wassef et al, 2003). A enzima glutamato descarboxilase (GAD) é o fator limitante na síntese do GABA, que é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). Estudos de expressão *post mortem* realizados em cérebros de portadores de esquizofrenia demonstraram a diminuição da expressão da proteína GAD1 no córtex pré-frontal e cerebelo (Guidotti et al, 2000), sugerindo uma redução da neurotransmissão GABAérgica.

## **2.6 Modelo da via serotoninérgica**

Alterações na função serotoninérgica parecem aumentar a vulnerabilidade a doenças psiquiátricas. O seu envolvimento na patogênese da esquizofrenia foi sugerido quando se observou que o LSD (*lysergic acid diethylamide*), uma droga que age no receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub>, tinha propriedades alucinógenas (Gaddum, Hameed, 1954). Receptores serotoninérgicos têm sido implicados tanto na gênese quanto no tratamento de psicose, sintomas negativos, distúrbios de humor e efeitos colaterais extrapiramidais (Meltzer, 1999). Os receptores serotoninérgicos do tipo 2A (5-HTR<sub>2A</sub>) são os mais estudados dessa via e estão amplamente presentes no córtex pré-frontal e hipocampo, áreas envolvidas na esquizofrenia (Matsumoto et al, 2005).

### 2.6.1 Esquizofrenia e neuroimagem

Estudos de ressonância magnética identificaram diversas regiões cerebrais implicadas na esquizofrenia, incluindo: aumento ventricular; déficits no volume cerebral total; e déficits no volume cerebral das regiões frontal, temporal e parietal (McCarley et al, 1996; Ward et al, 1996; Lawrie, Abukmeil, 1998; Shenton et al, 2001).

Shenton et al (2001) observaram que 80% dos estudos revisados relataram um aumento dos ventrículos laterais e 73% dos terceiros ventrículos. Além disso, 74% descreveram um envolvimento do lobo temporal medial, que inclui amígdala, hipocampo, giro parahipocampal e lobo temporal neocortical; e 59% relataram um envolvimento do lobo frontal, envolvendo o córtex pré-frontal e córtex orbitofrontal. Outras alterações incluíram anormalidades no lobo parietal (em 60% dos estudos) e cerebelo (31% dos estudos).

Uma metanálise de estudos de morfometria baseada em *voxel* (VBM) verificou que as alterações mais encontradas em pacientes com esquizofrenia eram reduções no giro temporal superior esquerdo e no lobo temporal medial esquerdo. Em adição, 50% dos estudos relataram alterações nos giros temporal superior direito, para-hipocampal esquerdo, frontal inferior esquerdo e frontal medial esquerdo (Honea et al, 2005).

Hulshoff Pol et al realizaram um estudo de seguimento de pacientes crônicos e observaram uma redução progressiva do tecido cerebral em até 20 anos após o acometimento dos primeiros sintomas, incluindo as áreas frontal e temporal (Hulshoff Pol, Kahn, 2008). Estudos longitudinais reportaram uma redução no volume do lobo frontal em um seguimento de pacientes de primeiro episódio psicótico e pacientes crônicos (Gur et al, 2003; Ho et al, 2003).

Apesar de não existir um consenso entre os achados de ressonância magnética relacionados à esquizofrenia, foram identificadas múltiplas alterações em regiões cerebrais possivelmente relevantes para a doença. Também, algumas delas

parecem estar presentes mesmo antes do acometimento dos sintomas, no período prodrômico, e progredir junto com a doença (Shenton et al, 2010).

## 2.6.2 Esquizofrenia e neuropsicologia

Portadores de esquizofrenia apresentam uma alteração no desempenho em uma grande variedade de testes neuropsicológicos. Dependendo do teste utilizado, estima-se que 40–90% desses pacientes apresentam déficits cognitivos (Saykin et al, 1991; Meltzer et al, 1996), sendo que essas alterações parecem ser mais pronunciadas em determinados setores do funcionamento cognitivo (Adad et al, 2000). Nesse contexto, os processos de atenção e memória, assim como as funções executivas, parecem ser afetadas nos indivíduos acometidos por essa condição psiquiátrica (Gray et al, 1990). As funções executivas são processos cognitivos que contribuem para a habilidade de responder adaptivamente a situações novas e também são a base de muitas habilidades cognitivas, emocionais e sociais (Lezak, 1993). Entre elas, os processos relacionados às habilidades de abstração e de flexibilidade conceitual envolvidas na solução de problemas (Goldberg et al, 1987).

Dentre os testes que avaliam atenção, foi identificado um menor desempenho dos portadores de esquizofrenia em relação a um grupo controle. Por exemplo, Oltmanns & Neale, utilizando o teste *Digit Span Forward*, que consiste na repetição verbal de sequências cada vez maiores de números, observaram que os pacientes tendiam a apresentar mais erros de repetição e o número máximo de dígitos a serem repetidos sem erros (*span*) era mais baixo (Oltmanns, Neale, 1975).

Em relação à memória, Kolb & Wishaw, utilizando o teste *Wechsler Memory Scale* observaram que os portadores de esquizofrenia apresentavam um resultado mais baixo quando comparados a um grupo controle em relação às funções de memória verbal e visual (Kolb, Whishaw, 1983).

Quanto às funções executivas, pacientes com esquizofrenia tendem a apresentar um menor desempenho no teste Wisconsin de Classificação de Cartas



(WCST- *Wisconsin card sorting Test*), que é aplicado na avaliação de processos relacionados a áreas pré-frontais do lobo frontal (Stuss et al, 1983). Dessa forma, foi sugerido que esses pacientes apresentam dificuldades em relação à utilização de conceitos abstratos na resolução de tarefas cognitivas, uma vez que os seus desempenhos eram caracterizados por um número elevado de respostas erradas e uma frequência aumentada de erros de perseveração (Goldberg et al, 1987).

### 2.6.3 Bases genéticas da esquizofrenia

Na população em geral, o risco de desenvolver esquizofrenia ao longo da vida é de 1% e esse risco tende a aumentar para familiares de portadores da doença: 4% para familiares de segundo grau e 9% para familiares de 1º grau (Plomin et al, 2008). Uma metanálise observou que a taxa de concordância para gêmeos monozigóticos varia de 41-65%, enquanto que para dizigóticos é de 0-28% (Cardno, Gottesman, 2000). A herdabilidade está estimada em 0,83, uma das mais altas entre doenças psiquiátricas (Cannon et al, 1998). Estudos de adoção também demonstraram que 7-10% das crianças adotadas cujos pais biológicos eram portadores de esquizofrenia apresentavam psicose, enquanto que 0-1% das crianças adotadas controles apresentaram problemas semelhantes (Wender et al, 1974; Tienari et al, 2004).

Inicialmente, os estudos genéticos em esquizofrenia eram baseados na análise de ligação, e posteriormente em estudos de associação. A partir dos resultados gerados, foram identificados genes ou regiões gênicas de suscetibilidade para a doença e que possuíam um fundamento biológico, como *NRG1*, relacionado ao desenvolvimento do SNC, o *DISC1*, relacionado ao metabolismo e arborização neuronal, o *DTNBP1* envolvido na transmissão glutamatérgica, e o *COMT*, que codifica uma enzima chave para a degradação das monoaminas. Esses estudos foram complementados posteriormente com a identificação de anormalidades cromossômicas em pacientes (Bassett et al, 2000), como a microdeleção 22q11.2 e com os estudos de associação em larga escala (*genome-wide association studies*) com polimorfismos de

nucleotídeo único (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) e, mais recentemente, com CNVs.

Apesar de existirem evidências quanto à participação de fatores genéticos na etiologia da esquizofrenia, aproximadamente 60% dos portadores de esquizofrenia não possuem um familiar com a doença (Gottesman, Erlenmeyer-Kimling, 2001).

Esses dados mostram uma correlação direta entre a carga genética e o risco, mas ao mesmo tempo, mostram que ela isoladamente não determina o desenvolvimento da doença, favorecendo um modelo aditivo de interação de fatores genéticos e ambientais.

#### **2.6.4 Fatores de risco ambientais para a esquizofrenia**

Dos eventos ambientais que foram associados à esquizofrenia, muitos ocorrem durante os períodos pré-natal ou perinatal, como a hipóxia, antes do acometimento dos sintomas psicóticos necessários para o diagnóstico, que geralmente se manifestam no final da adolescência ou início da vida adulta. Assim, existe um período entre os eventos ambientais e o aparecimento da doença, fundamentando a hipótese de que a esquizofrenia seja uma doença de neurodesenvolvimento (Lewis, Levitt, 2002). Dentre outros fatores ambientais que têm sido associados à esquizofrenia destacam-se: uso de *cannabis* e o processo de urbanização (van Os et al, 2010).

##### **2.6.4.1 *Copy Number Variation (CNV)* e esquizofrenia**

Na busca por fatores genéticos associados a doenças complexas, dentre elas a esquizofrenia, grande parte dos estudos tem focado em alterações na sequência do DNA, como os SNPs. Dessa forma, a fim de acelerar a procura de fatores genéticos associados a doenças humanas, o projeto internacional *HapMap*

(<http://www.hapmap.org>), um catálogo de variantes genéticas comuns, teve como objetivo mapear e compreender os padrões de diversidade genética no genoma humano (Thorisson et al, 2005). Na fase II do projeto, foram caracterizados mais de 3,1 milhões de SNPs em 270 indivíduos provenientes de quatro populações geograficamente distintas (Frazer et al, 2007).

Além dos SNPs, outra categoria de variação genômica encontrada no projeto *HapMap*, foram as CNVs. Essas variações no número de cópias também têm demonstrado a sua relevância na suscetibilidade a doenças humanas (Stefansson et al, 2008). As CNVs são segmentos de DNA, com tamanhos que variam de kilobases (kb) até Mb, que possuem um número variável de cópias quando comparado a um genoma de referência (Freeman et al, 2006). A partir das ferramentas de análise do genoma em larga escala, que possuem uma resolução intermediária entre a análise citogenética e o sequenciamento do DNA, foi demonstrado que as sequências variam em número de cópias entre indivíduos normais. Aproximadamente 5% do genoma humano parecem ser constituídos por essas variantes estruturais (Redon et al, 2006).

As CNVs podem alterar a dosagem gênica e envolver múltiplos genes ou regiões regulatórias, no entanto, nem sempre pode ser estabelecida uma correlação entre a dosagem gênica e expressão (Stranger et al, 2007; Henrichsen et al, 2009). Em geral, as deleções levam a um fenótipo mais grave do que as duplicações e as CNVs maiores (que abrangem mais genes) apresentam uma maior penetrância e/ou mais características clínicas associadas que as CNVs menores (Bassett et al, 2010). Recentemente, diversos estudos identificaram CNVs relevantes em uma série de doenças complexas, como transtornos do espectro do autismo (Sebat et al, 2007; Glessner et al, 2009), distúrbio bipolar (Moskvina et al, 2009; Zhang et al, 2009), deficiência intelectual (de Vries et al, 2005; Wagenstaller et al, 2007) e esquizofrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008; Stefansson et al, 2008).

Em 2008, Walsh et al observaram que CNVs associadas à esquizofrenia levavam à ruptura de genes que controlam o desenvolvimento e regulação neuronais, incluindo as vias da neuroregulina e do glutamato (Walsh et al, 2008). No mesmo ano, o Consórcio Internacional de Esquizofrenia verificou que CNVs raras e grandes (maiores que 100 kb) eram 1,15 vezes mais frequentes em portadores

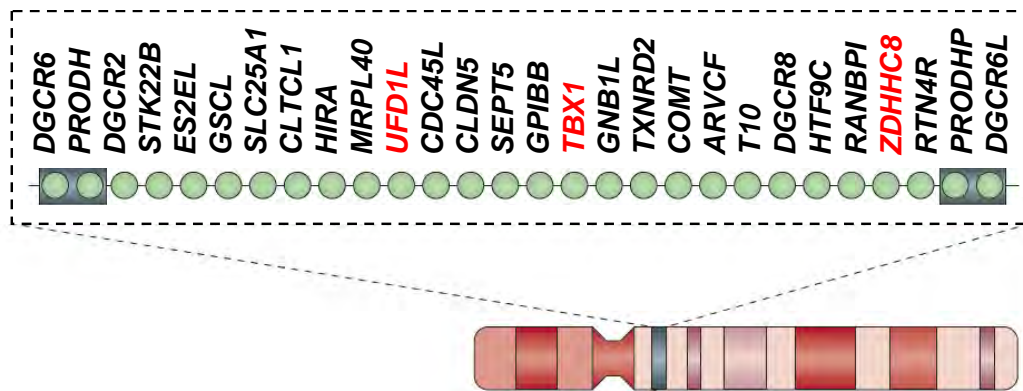
de esquizofrenia do que em controles (International Schizophrenia Consortium, 2008). Além disso, no mesmo estudo foram identificadas deleções em três regiões: 22q11.2, 15q13.3 e 1q21.1, as quais foram confirmadas por Stefansson et al (2008).

Estudos posteriores identificaram outras regiões cromossômicas associadas à esquizofrenia, incluindo: 4q32, 5q14.3, 8q23.3, 11q25, 16p13.1e 17q12 (Magri et al, 2010; Moreno-De-Luca et al, 2010). Outras CNVs estavam envolvidas tanto na esquizofrenia quanto nos transtornos do espectro do autismo, como as regiões 3q29 (Willatt et al, 2005; Mulle et al, 2010) e 16p11.2 (Weiss et al, 2008; McCarthy et al, 2009).

## **2.7 Síndrome da deleção 22q11.2 (22q11DS)**

A 22q11DS, uma das doenças genômicas mais comuns na população, compreende a síndrome de DiGeorge (DGS), síndrome velocardiofacial (VCFS), e a síndrome de anomalias faciais e conotruncais. Na maioria dos casos, resulta da microdeleção da região q11.2 do cromossomo 22, sendo que em mais de 90% dos casos, a deleção ocorre de forma esporádica havendo, entretanto, casos familiares (McDonald-McGinn et al, 2001).

A deleção mais comumente encontrada em indivíduos portadores dessa síndrome envolve uma região de 3 Mb, presente em cerca de 80-90% dos casos e inclui aproximadamente 60 genes conhecidos (Karayiorgou et al, 2010). Alguns pacientes apresentam uma deleção menor de 1,5 Mb, dentro da região de 3 Mb, (onde estão localizados 28 genes conhecidos), no entanto isso não implica em uma forma mais branda da doença, o que dificulta a correlação genótipo-fenótipo (Drew et al, 2011). A região de 1,5 Mb vêm sendo sugerida como a região crítica para a síndrome (Carlson et al, 1997) e, particularmente, para o aumento no risco de desenvolver transtornos psiquiátricos (Karayiorgou et al, 1995). Dentre os genes localizados nessa região específica estão o *UFD1L*, *TBX1* e *ZDHHC8*, como apresentado na Figura 1.



**Figura 1 – Mapa do locus 22q11.2.** As *Low Copy Repeats* que flanqueiam a região envolvida na deleção estão em caixas em cinza. Os genes da região crítica de 1,5 Mb estão indicados, sendo que os destacados foram estudados no presente trabalho relacionados à esquizofrenia (*ZDHHC8*), ao fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2 (*TBX1*) ou a ambos (*UFD1L*). Modificada de Karayiorgou et al (2010).

A 22q11DS está relacionada a defeitos nas células da crista neural, as quais, durante o desenvolvimento, migram, se distribuem e formam os tecidos e órgãos dos sistemas dos arcos faríngeos, incluindo o arco aórtico, timo, paratireóide e diversas regiões do palato, faringe e face (Momma, 2010). Dessa forma, o fenótipo dessa doença é altamente variável e pode afetar múltiplos órgãos e tecidos. A alteração cardíaca conotruncal é a característica predominante da 22q11DS (Motzkin et al, 1993; Moore et al, 2004), sendo que outras características também estão associadas, tais como: palato fendido, aplasia ou hipoplasia de timo e glândula paratireóide com anormalidades funcionais de células T, hipocalcemia e dismorfias faciais, incluindo hipertelorismo, pálpebras com aparência de inchadas, ponta do nariz bulbosa e micrognatia (McDonald-McGinn et al, 1999). Além disso, portadores da 22q11DS apresentam déficits cognitivos e comportamentais e um grande risco de desenvolver doenças psiquiátricas, sendo que a mais prevalente delas é a esquizofrenia (Karayiorgou et al, 2010).

A incidência estimada para essa síndrome é de 1 em 4.000-10.000 nascidos vivos (Goldmuntz, 2005), o que a torna uma das síndromes de microdeleção mais comuns na população, indicando uma alta taxa de mutação ou de rearranjo dentro da região 22q11.2. Além disso, outros rearranjos na região já foram descritos, incluindo o da síndrome do *cat eye*, o cromossomo supernumerário der 22 t(11;22) e outras translocações associadas a tumores, como a translocação t(9;22) e t(8;22) (Emanuel, Saitta, 2007).

Através de estudos moleculares, foi identificada a presença de múltiplas cópias de uma complexa unidade de repetição região-específica localizadas na região 22q11.2, que foram denominadas de *Low Copy Repeats* (LCRs) ou duplicações segmentais. As LCRs, por compartilharem uma similaridade entre as sequências maior que 96%, são estruturas que favorecem o *crossing-over* desigual, predispondo à recombinação homóloga não alélica intra e intercromossômica (Shaikh et al, 2007). Esse mecanismo pode originar deleções, duplicações ou inversões dessas regiões (Shaffer, Lupski, 2000), o que poderia explicar o mecanismo de origem da deleção 22q11.2. Quatro blocos principais, referenciadas como unidades de LCRs de A a D, foram descritas na região. Essas LCRs apresentam um tamanho de 100 – 400 kb, sendo que as duas maiores são a unidade mais proximal (LCR-A) e a mais distal (LCR-D), que flanqueiam a região de deleção típica de 3 Mb.

## 2.8 Síndrome da deleção 22q11.2 e esquizofrenia

As microdeleções 22q11.2 representam cerca de 1-2% dos casos esporádicos de esquizofrenia (Karayiorgou et al, 1995). Em adição, foi observado que, durante a adolescência ou início da vida adulta, aproximadamente um terço dos portadores da deleção 22q11.2 desenvolvem esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo, representando um risco de 25-31 vezes mais do que da população geral (Pulver et al, 1994; Murphy et al, 1999). Além disso, reciprocamente, a frequência dessa microdeleção em portadores de esquizofrenia pode ser de 12-80 vezes maior que o da população em geral (Karayiorgou, Gogos, 2004). Dessa forma, foi sugerido que a deleção 22q11.2 seria um verdadeiro subtipo genético da esquizofrenia (Tam et al, 2009).

O aumento no risco para esquizofrenia pode ser resultado da haploinsuficiência de um ou mais genes em 22q11.2. Apesar de não terem sido identificados e reproduzidos os genes que predisõem para a esquizofrenia, alguns candidatos funcionais dentro da região deletada têm sido propostos, incluindo os genes *COMT*, *PRODH*, *DGCR8* e *ZDHHC8*. Polimorfismos nesses genes vêm sendo muito investigados na esquizofrenia, principalmente os SNPs.

Dentre os genes presentes na região 22q11.2, o gene *COMT* é um dos mais estudados e, em particular, o seu polimorfismo funcional Val158Met. As duas isoformas da proteína parecem influenciar níveis corticais de dopamina e habilidades cognitivas tanto em humanos quanto em modelos animais transgênicos (Drew et al, 2011). Além disso, Caspi et al observaram uma interação entre o uso de *cannabis* na adolescência e o polimorfismo Val158Met no acometimento da esquizofrenia, sugerindo que a função de alguns genes de suscetibilidade seja influenciar a resposta a ambientes patogênicos (Caspi et al, 2005).

Com a identificação da relevância da microdeleção 22q11.2 na esquizofrenia, demonstrou-se que as deleções ou duplicações de regiões cromossômicas poderiam exercer um papel importante na etiologia da esquizofrenia (Karayiorgou et al, 1995). Tais mutações, atualmente conhecidas como CNVs estão sendo amplamente investigadas em diversas doenças, incluindo a esquizofrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008; Stefansson et al, 2008).

### **2.8.1 O gene *UFD1L* na patogênese da 22q11DS e na esquizofrenia**

O gene *UFD1L*, localizado no meio da região 22q11.2, codifica uma proteína envolvida em uma via metabólica da degradação de proteínas ubiquitina-dependentes (Kunte et al, 2001). O gene apresenta 12 éxons (Figura 2) e o promotor está localizado a 463 pares de bases (pb) *upstream* da primeira base do códon de iniciação, sendo que, especificamente, a região de -198 a -463 pb é responsável pela maior parte da atividade (Amati et al, 2002). Apesar do gene *UFD1L* não ter uma função claramente definida, diferentes linhas de evidências vêm indicando que ele parece estar envolvido na patogênese tanto da 22q11DS quanto da esquizofrenia.



**Figura 2 – Estrutura genômica do gene *UFD1L* e a posição dos 3 polimorfismos investigados: rs5992403 (no promotor), rs5746744 e rs1547931 (ambos no íntron 3).** As caixas e linhas verticais representam cada um dos 12 éxons do gene. Adaptado de Xie et al (2008).

Em camundongos, o gene *Ufd1l* foi encontrado expresso nos arcos faríngeos, palato, região frontonasal, telencéfalo, e tecido cardíaco (Yamagishi et al, 1999). Em adição, a expressão do gene *Ufd1l* está reduzida em camundongos mutantes para *dHAND*, um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento cardíaco normal (Yamagishi et al, 2003). Apesar de Lindsay et al demonstrarem que a hemizigosidade do gene *Ufd1l* não era suficiente para causar defeitos do arco aórtico em camundongos, a perda de ambos os alelos era letal (Lindsay et al, 1996). Yamagishi et al também observaram uma expressão aumentada de *Ufd1l* no cérebro, coração, músculo esquelético e timo de embriões de galinha (Yamagishi et al, 2003).

Além disso, em humanos foi observado que o gene *UFD1L* é expresso a partir da décima semana gestacional e continua a ser transcrito durante o período fetal e pós-natal (Novelli et al, 1998). Yamagishi et al observaram que o gene *UFD1L* estava deletado em todos os 182 pacientes estudados com 22q11DS. Em adição, foi relatado um paciente com fenótipo da 22q11DS que apresentava uma pequena deleção, que incluía os cinco primeiros éxons do gene *CDC45L* e os éxons de 1 a 3 do gene *UFD1L* (Yamagishi et al, 1999). Com relação às manifestações cardíacas, Mohamed et al encontraram associação entre a válvula aórtica bicúspide, uma malformação cardíaca congênita relativamente comum, e reduções na expressão do gene *UFD1L* (Mohamed et al, 2005).

Embora existam evidências do envolvimento desse gene com o fenótipo da 22q11DS, alguns autores acreditam que esse gene não seja o responsável pela maioria dos casos da síndrome sem deleção, uma vez que não foi encontrada mutação nesse gene em pacientes com características da síndrome (Wadey et al,



1999) ou em pacientes com tetralogia de Fallot isolada, uma cardiopatia frequentemente encontrada na síndrome (Chung et al, 2001).

Quanto à esquizofrenia, três estudos tanto de caso-controle quanto de famílias investigaram a associação de polimorfismos do gene *UFD1L* e esse transtorno psiquiátrico (De Luca et al, 2001; Xie et al, 2008; Ota et al, 2010). De Luca et al observaram uma associação entre um polimorfismo que envolvia uma transição de A para G localizado na posição -277 (rs5992403) (De Luca et al, 2001), identificado por Wadey et al (Wadey et al, 1999). Em uma população de 88 portadores de esquizofrenia e 92 controles de origem italiana ou canadense, esse estudo verificou que a presença do alelo A conferia uma chance de 1,75 vezes de desenvolver a doença (De Luca et al, 2001). Além disso, foi realizada uma análise de *Transmission Disequilibrium Test* em 22 trios canadenses, em que se verificou uma transmissão preferencial do alelo A para o portador da doença, reforçando os achados no estudo caso-controle (De Luca et al, 2001). Em adição, nesse mesmo trabalho, foi realizado um estudo de transfecção que observou que o mesmo alelo A levava a um aumento de 55% na proteína UFD1L (De Luca et al, 2001).

Xie et al, a partir de um mapa de desequilíbrio de ligação baseado em SNP, associaram outros 2 polimorfismos intrônicos (rs5746744 e rs1547931) à esquizofrenia (Xie et al, 2008). Nesse estudo, a partir de 304 trios de origem chinesa foi verificada uma associação alélica dos polimorfismos rs5746744 e rs1547931 e dos haplótipos compostos por 2 SNPs: rs5992403-rs5746744, rs5746744-rs1547931 e rs1547931-rs2238769, bem como os compostos pelos 4 SNPs, com a doença. No entanto a associação do polimorfismo rs5992403 encontrada anteriormente por De Luca et al, 2001, não foi confirmada. Além disso, Xie et al confirmaram os achados dos polimorfismos rs5746744 e rs1547931 em uma outra população de 330 casos e 334 controles de origem chinesa. Como esses dois polimorfismos estão localizados no íntron 3 e sabe-se que o éxon 3 é excisado em umas das isoformas do RNA mensageiro (RNAm), os autores especulam que esses dois SNPs, ou uma variante próxima, poderiam afetar o processo de *splicing* do RNAm (Xie et al, 2008).

Além disso, Ota et al (2010) não encontraram uma associação do polimorfismo rs5992403 com a esquizofrenia, no entanto, foi observada uma

participação dele na idade de acometimento da doença (artigo gerado a partir dos dados desse trabalho).

### 2.8.2 O gene *ZDHHC8* na patogênese da esquizofrenia

O gene *ZDHHC8*, composto por 11 éxons, compreende cerca de 16 kb e pertence a uma família de enzimas que compartilham um domínio catalítico rico em cisteína. Esse gene codifica uma enzima transmembrânica do tipo palmitoiltransferase que é altamente expressa no cérebro de adultos. A palmitoilação é uma modificação pós-traducional importante para o tráfego de proteínas e para a modulação de diversas proteínas citossólicas e de membrana, especialmente em neurônios (el-Husseini Ael, Brecht, 2002).

Mukai et al observaram que a proteína PSD95, uma molécula adaptadora que modula o número de espinhas dendríticas, sofre palmitoilação através de *ZDHHC8* (Mukai et al, 2008). Em cérebros de camundongos adultos, foram observados altos níveis de expressão da proteína *ZDHHC8* no córtex e no hipocampo, áreas que parecem desempenhar um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia (Mukai et al, 2004). Em adição, camundongos mutantes para o gene *ZDHHC8* demonstraram déficits cognitivos e comportamentais, e na inibição pré-pulso, um endofenótipo neurocognitivo presente na esquizofrenia (Mukai et al, 2004). Mukai et al sugeriram que a proteína *ZDHHC8* afeta o comportamento ao interferir na transmissão glutamatérgica, um sistema importante para o desenvolvimento da esquizofrenia (Mukai et al, 2004).

Utilizando um mapa genético de 72 SNPs distribuídos na região de 1,5 Mb em 22q11.2, Liu et al detectaram uma associação de duas sub-regiões com a esquizofrenia, sendo que, em uma delas, se encontrava o polimorfismo rs175174 (A/G), do gene *ZDHHC8*, que apresentou a mais forte associação de todos os 72 SNPs investigados (Liu et al, 2002). Posteriormente, Mukai et al demonstraram *in vitro* que o polimorfismo rs175174 modula a retenção do íntron 4, influenciando no nível de transcrito totalmente funcional. Além disso, estudando 389 trios de portadores de

esquizofrenia e seus pais, de origem africana ou americana, eles verificaram que o alelo A era mais transmitido para portadoras de esquizofrenia do sexo feminino, mas essa associação não era reproduzida em homens (Mukai et al, 2004).

A partir desses dois estudos, o gene *ZDHHC8* e, particularmente, o polimorfismo rs175174 vem sendo amplamente investigado quanto à suscetibilidade a transtornos psiquiátricos. Em 2004, utilizando tanto estudos caso-controle quanto de famílias, Chen et al confirmaram a associação do polimorfismo rs175174 com a esquizofrenia e também de outros dois polimorfismos no mesmo gene em uma população chinesa. No entanto, nesse estudo, o alelo G foi indicado como o de suscetibilidade à doença, contrariando os achados de Mukai et al (Chen et al, 2004).

Outros estudos realizados em pacientes com esquizofrenia, provenientes de populações europeias e asiáticas, não encontraram associação entre o SNP rs175174 e a doença (Faul et al, 2005; Otani et al, 2005; Saito et al, 2005; Glaser et al, 2006; Demily et al, 2007). Em 2010, Xu et al realizaram uma metanálise utilizando 10 estudos independentes e também não observaram associações positivas com a esquizofrenia, mesmo após correção da estratificação para etnia ou gênero (Xu et al, 2010). Além disso, em população coreana, Shin et al também não observaram diferenças entre casos e controles quanto ao polimorfismo rs175174, no entanto, eles relataram uma associação com anormalidade em movimentos oculares de rastreo lento, um endofenótipo da esquizofrenia (Shin et al, 2010).

### **2.8.3 O gene *TBX1* na patogênese da 22q11DS**

O gene *TBX1*, ortólogo ao *Tbx1* de camundongos, pertence a uma família de genes que codifica fatores de transcrição (Bollag et al, 1994; Kispert et al, 1995). O *TBX1* possui três isoformas, mas o transcrito 9C é o principal transcrito nos humanos (Gong et al, 2001) (Figura 3).



**Figura 3 – Estrutura genômica do gene *TBX1*.** Existem três transcritos: 9A, 9B e 9C, sendo que os éxons de 1 a 8 são comuns para os três transcritos e o éxon 10 só está presente no transcrito 9B. Adaptado de Yagi et al (2003).

Outras proteínas *T-box* foram identificadas em outras espécies e parecem desempenhar um papel no desenvolvimento do coração. Além disso, genes dessa família são dose-sensíveis e três deles foram associados a outras doenças (Yagi et al, 2003).

Estudos em camundongos demonstraram que o gene *Tbx1* se expressa durante a embriogênese nos arcos faríngeos, bolsas faríngeas e vesícula ótica (Chieffo et al, 1997) e que sua haploinsuficiência causa defeitos cardíacos e vasculares (Lindsay et al, 2001; Vitelli et al, 2002). Além disso, camundongos homocigotos sem *Tbx1* também apresentam um fenótipo semelhante à 22q11DS, incluindo defeitos no timo e na paratireóide, problemas cardíacos e alguns defeitos craniofaciais e esqueléticos (Jerome, Papaioannou, 2001).

Dos aproximadamente 30 genes comumente deletados nos pacientes com a 22q11DS, o *TBX1* é o único gene que mostrou, após extensas análises funcionais em camundongos, a relação entre haploinsuficiência com um fenótipo convincentemente similar ao da síndrome humana (Baldini, 2005). Além disso, foi relatado um paciente com a 22q11DS que apresentava uma pequena deleção de 750 kb envolvendo os genes *TBX1* e *COMT* (McQuade et al, 1999).

Inicialmente, a análise de mutação em um total de 162 pacientes sem deleção falhou em identificar alterações patogenicamente significantes (Chieffo et al, 1997; Gong et al, 2001; Conti et al, 2003).

Apenas em 2003, Yagi et al identificaram três mutações do *TBX1*, duas de sentido trocado (F148Y e G310S) e uma de alteração no quadro de leitura (1223delC) em 5 pacientes com fenótipo característico, mas com ausência da deleção

22q11.2, sugerindo um importante papel do gene na origem das características principais do fenótipo, incluindo-se os defeitos cardíacos (Yagi et al, 2003).

Uma outra mutação de alteração no quadro de leitura (1320-1342del23pb) foi encontrada por Paylor et al em uma família com características da síndrome mas sem a deleção 22q11.2. Os dois filhos portadores da mutação apresentavam defeitos cardíacos, mas não a mãe, também portadora. Além disso, um dos filhos apresentava síndrome de Asperger, sugerindo que a haploinsuficiência de *TBX1* poderia predispor a doenças psiquiátricas (Paylor et al, 2006).

Em 2007, Zweier et al selecionaram 10 pacientes sem a deleção 22q11.2 e, por sequenciamento direto, encontraram, em um deles, uma mutação de sentido trocado (582C>G) que leva à substituição de uma histidina conservada evolutivamente por uma glutamina na posição 194 dentro do domínio T-box (Zweier et al, 2007).

No mesmo ano, Torres-Juan et al identificaram duas mutações, uma de sentido trocado (1232T>C) e uma na região 5' não traduzida (-39C>T) que afeta um nucleotídeo altamente conservado evolutivamente (Torres-Juan et al, 2007). A análise funcional da mutação -39C>T mostrou que ela aumenta em pelo menos duas vezes a produção da proteína *TBX1*. Como esta mutação pode ser considerada funcionalmente similar à microduplicação 22q11.2 e esta foi descrita em pacientes com deficiência mental (Yobb et al, 2005), os autores analisaram 200 pacientes com deficiência mental e negativos para a síndrome do X frágil e encontraram três portadores da mutação -39C>T.

Não foram encontradas mutações no gene *TBX1* em dois estudos que avaliaram 91 pacientes portadores de defeitos cardíacos congênitos não-sindrômicos (Conti et al, 2003; Cabuk et al, 2007). Além disso, dois outros trabalhos não encontraram diferenças significantes nas frequências dos alelos ou haplótipos de polimorfismos no gene *TBX1* em pacientes com alterações psiquiátricas. Funke et al analisaram 9 SNPs do gene *TBX1* em 446 pacientes com doenças psiquiátricas sendo 226 com esquizofrenia, 67 com doença esquizoafetiva, 82 com doença bipolar e 29

com depressão maior (Funke et al, 2007). Ma et al avaliaram três SNPs em 328 esquizofrênicos e 288 controles normais da população chinesa (Ma et al, 2007).



### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

A casuística do presente trabalho foi composta por 200 pacientes com esquizofrenia regularmente acompanhados, 200 indivíduos controles e 70 portadores do fenótipo clínico da 22q11DS. Os participantes do estudo foram selecionados, principalmente, dos centros descritos abaixo:

1. Pacientes com esquizofrenia foram provenientes do Ambulatório de Psiquiatria do Hospital São Paulo pelo Programa de Assistência à Esquizofrenia (PROESQ);

2. Pacientes portadores do fenótipo clínico da 22q11DS foram selecionados pelo Centro de Genética Médica da UNIFESP, pelo Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP e pelo Setor de Neurogenética e Neurofisiologia da FMRP-USP;

3. Indivíduos controles sem diagnóstico ou histórico familiar de doenças psiquiátricas, selecionados pelo Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC) da UNIFESP e provenientes da cidade de Itapetininga, do centro de solidariedade aos trabalhadores (CST) e das empresas de limpeza, manutenção e segurança da UNIFESP.

Apenas para a análise de CNVs, foram incluídos 89 portadores de esquizofrenia e 127 indivíduos controles de Porto Alegre, em colaboração com o Dr. Diogo Lara. Os pacientes eram provenientes do ambulatório de esquizofrenia da residência do Departamento de Psiquiatria da PUC-RS e da Associação Gaúcha de Familiares de Pacientes Esquizofrênicos e Demais Doenças Mentais.



O grupo de portadores do fenótipo clínico da 22q11DS foi descrito previamente por Pacanaro et al (2010), cujo estudo envolveu a investigação da presença, origem e extensão da deleção 22q11.2 por meio de FISH (hibridação *in situ* por fluorescência) e MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) nesses pacientes. Dessa forma, a seguir estão caracterizados apenas os grupos de portadores de esquizofrenia e o de indivíduos controles.

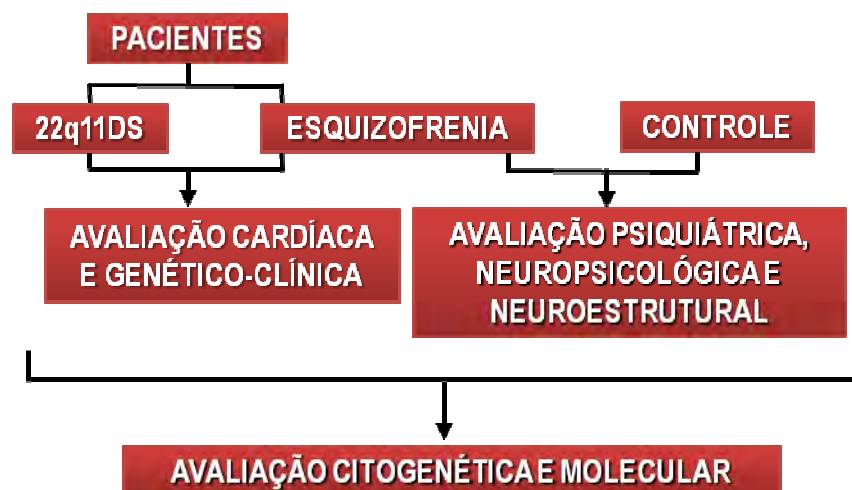
Na Tabela 1, estão descritos dados como sexo, média, mediana, máximo, mínimo e desvio padrão (DP) da idade e da idade de acometimento da doença, fornecidos através da avaliação psiquiátrica. Também estão informados a média e DP da ancestralidade, obtidos com o uso de marcadores genéticos.

**Tabela 1 – Caracterização da amostra de pacientes com esquizofrenia e indivíduos controle.**

Variável	Casos		Controles	
	N	Frequência	N	Frequência
Sexo	200		200	
Masculino	136	68,0%	110	55,0%
Feminino	64	32,0%	90	45,0%
Refratariedade	151			
Sim	75	49,6%		----
Não	76	50,4%		----
		<b>Valores</b>		<b>Valores</b>
Idade na 1ª avaliação psiquiátrica	199		185	
Média (DP)		♂ 35,08 (9,91) / ♀ 37,92 (12,34)		♂ 38,59 (13,40) / ♀ 37,57 (13,12)
Mediana		♂ 32,5 / ♀ 34		♂ 36 / ♀ 36
Idade mínima		♂ 16 / ♀ 18		♂ 16 / ♀ 17
Idade máxima		♂ 64 / ♀ 68		♂ 74 / ♀ 73
Idade de acometimento	184			
Média (DP)		♂ 23,31 (7,09) / ♀ 23,17 (7,36)		----
Mediana		♂ 22 / ♀ 21		----
Idade mínima		♂ 13 / ♀ 12		----
Idade máxima		♂ 57 / ♀ 43		----
Ancestralidade	172		149	
Européia (DP)		0,670 (0,22)		0,698 (0,19)
Africana (DP)		0,178 (0,17)		0,160 (0,16)
Nativo Americana (DP)		0,152 (0,14)		0,142 (0,11)

N: Número de indivíduos analisados; DP: Desvio padrão

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP (Processos nº 01737/06 e nº1076/07) (Anexos I e II). Os pacientes e indivíduos controles foram informados da realização da pesquisa e assinaram um termo de consentimento para participar desta (Anexos III e IV). Como esquematizado na Figura 4, os pacientes com esquizofrenia e os portadores do fenótipo clínico da 22q11DS foram submetidos às avaliações cardíaca e genético-clínica. Além disso, os pacientes com esquizofrenia e os indivíduos controles realizaram avaliações psiquiátricas, neuropsicológicas e neuroestruturais. De toda a casuística foi coletado sangue para a análise genética.



**Figura 4 – Desenho esquemático representando as avaliações a que foram submetidos cada grupo.**

22q11DS: Síndrome da deleção 22q11.2.

## 3.2 Avaliação psiquiátrica

### 3.2.1 Pacientes portadores de esquizofrenia

Os pacientes portadores de esquizofrenia foram recrutados no PROESQ, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan. Todos os indivíduos

que concordaram em participar na pesquisa foram submetidos a uma avaliação clínica inicial que consiste na aplicação da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) – SCID I (First et al, 1996), módulos A, B, C, D e E. Essa avaliação teve duração estimada de 30 minutos e os indivíduos que preencheram critérios para esquizofrenia segundo a SCID-I foram convidados a fazer uma avaliação complementar que consistiu de:

1. *Positive and Negative Symptom Scales*: Instrumento desenhado para avaliar sintomas positivos, negativos e de psicopatologia geral em pacientes portadores de esquizofrenia (Kay et al, 1987). Instrumento traduzido e validado no Brasil por Vessoni (Vessoni, 1993);
2. *Calgary Depression Scale*: Avalia sintomatologia depressiva atual. Instrumento traduzido e validado no Brasil por Bressan et al (Bressan et al, 1998);
3. Entrevista estruturada para avaliar o uso pregresso e atual de drogas. Módulo de uso de drogas da Escala de Gravidade de Dependência (*Addiction Severity Index – ASI*) adaptado pelos pesquisadores;
4. Escala abreviada de Qualidade de Vida da Organização Mundial de Saúde (WHOQOL BREF);
5. *Clinical Global Impressions- Severity*: Avalia a gravidade da doença;
6. *Global Assessment of Functioning*: Avalia o nível de comprometimento funcional dos pacientes.

Para todos os instrumentos mencionados acima foi realizado treinamento da aplicação para os entrevistadores.

Os pacientes foram agrupados quanto à idade de acometimento (acima ou abaixo de 18 anos) e também foram agrupados quanto à refratariedade. O

algoritmo mais recente, o *Schizophrenia Algorithm* da *International Psychopharmacology Algorithm Project* ([www.ipap.org](http://www.ipap.org)), define que um paciente é considerado como refratário se não responder a dois ensaios clínicos de quatro a seis semanas de duração de monoterapia com dois antipsicóticos de segunda geração, ou a dois ensaios com um antipsicótico de primeira geração, se não estiverem disponíveis os de segunda geração (Elkis, Meltzer, 2007).

### 3.2.2 Indivíduos controles

Os indivíduos controles foram recrutados pelo LiNC, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan, e pareados quanto a sexo e idade e ancestralidade. O diagnóstico psiquiátrico atual ou pregresso foi avaliado pela SCID-I. Foram critérios de exclusão: ter diagnóstico psiquiátrico atual ou pregresso, ter história familiar de transtorno psicótico grave ou transtorno mental grave na família, ser incapaz de fornecer consentimento livre e esclarecido, ser portador de qualquer doença clínica crônica de natureza inflamatória ou tumoral.

Após confirmação do perfil do indivíduo como controle ele foi submetido a uma avaliação clínica complementar descrita abaixo:

1. *Calgary Depression Scale*: Avalia sintomatologia depressiva atual. Instrumento traduzido e validado no Brasil por Bressan et al (1998);
2. Entrevista estruturada para avaliar o uso pregresso e atual de drogas. Módulo de uso de drogas da Escala de Gravidade de Dependência (ASI) adaptado pelos pesquisadores;
3. Escala WHOQOL BREF;

### 3.3 Avaliação genético-clínica

Os pacientes portadores de esquizofrenia e do fenótipo clínico da 22q11DS foram submetidos a um protocolo especial de estudo genético-clínico que consiste em avaliação clínica e exame antropométrico.

Foram realizados os seguintes procedimentos: 1) Anamnese com o próprio paciente e/ou seus familiares abordando: identificação, etnia, antecedentes mórbidos pessoais e familiares, tempo de diagnóstico da doença, presença de consanguinidade e construção do heredograma; 2) Exame físico geral e genético-clínico com descrição detalhada do fenótipo externo e antropometria segundo ficha padrão própria, modificada a partir dos dados da *Specialist Fact Sheet* retirada do site *The Velo-Cardio-Facial Syndrome Educational Foundation* (Anexo V), para investigar a presença de sinais da 22q11DS.

As medidas antropométricas que compuseram o exame físico foram: peso, estatura e perímetro cefálico. Na face foram obtidas as distâncias intercantais externa (DICE) e interna (DICI), a partir das quais foi calculada a distância inter-pupilar através da fórmula  $(DICE-DICI)/2 + DICI$ , o comprimento do filtro labial e tamanho das orelhas. Nos membros foram medidos o comprimento total das mãos e do dedo médio, o comprimento dos pés, a distância pelvi-podálica e envergadura. Todas as medidas foram realizadas segundo técnica descrita por Hall et al (1989) e comparadas com tabelas apropriadas. Foram consideradas alteradas as medidas que se apresentavam desviadas além do segundo DP da média, para baixo ou para cima. Em todos os pacientes foi realizada a documentação fotográfica.

Para avaliar se os pacientes apresentavam hipocalcemia, foi realizada dosagem de cálcio sérico no Laboratório Central do Hospital São Paulo, sendo adotados os valores de referência do laboratório (8,0–10,5 mg/dL).

### **3.4 Avaliação cardíaca**

Para um refinamento da avaliação genético-clínica, os pacientes foram submetidos a uma avaliação cardíaca. As anormalidades cardíacas foram

avaliadas pelo exame físico, eletrocardiograma e ecocardiograma transtorácico com *Doppler* a cores. Foram utilizadas para esta avaliação fichas cardiológicas padronizadas.

### 3.5 Avaliação neuropsicológica

Um total de 115 pacientes portadores de esquizofrenia foi submetido a uma bateria de testes neuropsicológicos a fim de avaliar memória de trabalho visual, controle inibitório, flexibilidade cognitiva, aprendizado e memória verbal, velocidade de processamento, planejamento, abstração, fluência verbal e quociente de inteligência. Para tanto, foram utilizados os seguintes testes:

1. **Teste de Memória de Memória Visual** (Primi, 2002). Esse instrumento foi aplicado conforme descrito por Berberian et al (2009).

2. **Hopkins Verbal Learning Test Revised (HVLTR)** avalia memória episódica verbal e consiste em três apresentações de uma lista de 12 palavras, com evocação imediata após cada apresentação (variáveis Hopkins 1, Hopkins 2 e Hopkins 3), evocação tardia após 20-25 minutos (variável Hopkins evocação) e reconhecimento.

3. **Lista de palavras.** O teste avalia atualização e foi adaptado de Yntema (Yntema, 1963).

4. **Teste de sequência de letras.** O teste também avalia atualização e foi adaptado de Morris e Jones (Morris, Jones, 1990).

5. **Teste de Stroop computadorizado** (Capovilla et al, 2007). A versão computadorizada do teste de *Stroop* foi utilizada para avaliar controle inibitório. Esse instrumento foi aplicado conforme descrito por Berberian et al (2009).

6. **Teste de Trilhas.** Esse teste foi utilizado para medir flexibilidade cognitiva. Esse instrumento foi aplicado conforme descrito por Berberian et al (2009).

7. **Teste de Geração Semântica** (Capovilla et al, 2007). Por meio desse teste foi avaliado o controle inibitório. Esse instrumento foi aplicado conforme descrito por Berberian et al (2009).

8. **Teste WCST**. Um instrumento que foi desenvolvido para avaliar o raciocínio abstrato e modificação de estratégias cognitivas como resposta a alterações nas contingências ambientais. O teste foi adaptado de Robinson et al (Robinson et al, 1991).

9. **Torre de Londres**. Compreende uma base com três hastes verticais e três esferas coloridas (vermelha, verde e azul) e avalia a habilidade de planejamento. O teste foi adaptado por Krikorian et al (Krikorian et al, 1994).

10. **Teste de Fluência Verbal**. A versão do teste utilizada requeria que o participante falasse o maior número possível de palavras começadas com as letras F, A e S, tendo um minuto para cada letra (Benton, Hamsher, 1989).

11. **Teste Não-Verbal de Inteligência**. Para a avaliação dos aspectos de inteligência foi utilizado o Teste Não Verbal de Inteligência – R1 (Oliveira, Alves, 2002), que avalia aspectos de inteligência por medidas não verbais.

A análise estatística associando as variáveis neuropsicológicas com genótipos dos quatro polimorfismos estudados foi realizada por meio de Análise de Covariância (ANCOVA) com *post hoc* de Bonferroni. Foi assumido um índice de significância  $p < 0,05$ .

### 3.6 Avaliação neuroestrutural

Os pacientes portadores de esquizofrenia e os indivíduos controles foram submetidos a uma avaliação neuroestrutural utilizando-se de imagens de ressonância magnética. Esta avaliação foi realizada em colaboração com a Dra Andrea Parolin Jackowski do Departamento de Psiquiatria da UNIFESP.



As imagens de RM foram adquiridas em um aparelho (Magnetom Sonata (Maestro Class) — Siemens AG, Erlangen, Alemanha) de 1.5 Tesla utilizando uma bobina de crânio com 8 canais. A sequência de aquisição utilizada foi uma sequência T1 sagital gradiente eco 3D com reconstrução multiplanar (TR=2000ms, TE=3.42, FOV= 256 mm, flip angle=15°, espessura = 1mm, matriz= 256X 256, totalizando 160 cortes).

## Análise

O *Statistical Parametric Mapping* (SPM) (*Wellcome Department of Cognitive Neurology*, Reino Unido) é um conjunto de ferramentas gratuitas para o pré-processamento e análise estatística de dados de neuroimagem e sinais elétricos, criado pelo *Wellcome Department of Imaging Neuroscience do University College of London*. A interface com o sistema operacional (Windows®, Linux, Macintosh®) é realizada através do Matlab®.

Para os dados de ressonância magnética, a metodologia para a análise volumétrica voxel-a-voxel utilizada foi a VBM (Ashburner, Friston, 2000), *toolbox* do SPM. Nesta técnica, as imagens de ressonância magnética são segmentadas automaticamente em extratos de substância cinzenta, substância branca e líquido e após vários processos adicionais, os compartimentos podem ser comparados estatisticamente entre os grupos, a fim de detectar agrupamentos de voxels nos quais há diferenças volumétricas significativas.

Neste estudo utilizamos o *toolbox* VBM5 que está implementado no SPM5, que é executado em Matlab®. As imagens pesadas em T1, no seu formato original (DICOM), foram convertidas para o formato NIFTI-1. As imagens convertidas foram segmentadas em dois compartimentos (substância cinzenta e branca) e normalizadas espacialmente em relação ao *template* disponível no SPM. As imagens de substância cinzenta normalizadas foram suavizadas com filtro gaussiano de 10 mm. Os mapas probabilísticos da substância cinzenta foram comparados voxel-a-voxel usando uma ANCOVA, sendo o volume encefálico utilizado como covariável. O valor de significância utilizado foi de  $p < 0.05$ , corrigido para múltiplas comparações utilizando correções para pequenos volumes.

### **3.7 Avaliação genética**

#### **3.7.1 Estudo citogenético**

##### **3.7.1.1 Coleta de sangue e cultura de linfócitos**

Para os pacientes portadores de esquizofrenia ou do fenótipo clínico da 22q11DS foram coletados cerca de 5 mL de sangue em tubos contendo anticoagulante heparina para o exame citogenético. As culturas de linfócitos e as preparações cromossômicas foram realizadas segundo modificação da técnica de Moorhead et al (1960).

Foram semeados cerca de 0,5 mL de sangue total, em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, *Grand Island*, EUA), 10% de soro fetal bovino e 0,2 mL de fito-hemaglutinina. As culturas foram homogeneizadas e colocadas em estufa a 37°C por 72 horas. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de colchicina (Sigma, Sait Louis, EUA), a uma concentração final de 0,08 µg/mL.

Após 45 minutos, os tubos foram centrifugados a 1100 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 4 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M), o material foi ressuspendido e colocado em estufa a 37°C por 8 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de solução fixadora, contendo metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 3:1, e os tubos foram novamente centrifugados a 1100 rpm por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Ao sedimento, foram adicionados 4 mL de solução fixadora. Esse procedimento foi repetido três vezes e os tubos foram colocados em geladeira a 4°C durante uma hora antes da preparação das lâminas. Em seguida, o material foi ressuspendido e pingado em lâminas previamente lavadas.

### 3.7.1.2 Coloração cromossômica por bandamento G

A coloração em bandamento G foi realizada segundo modificação da técnica descrita por Sanchez et al (1973).

Após permanecerem por cinco dias em estufa a 37°C, as lâminas foram imersas em tampão fosfato 0,06 M a 37°C por 5 minutos.

Em seguida, uma solução de corante foi preparada na proporção de 1:3 de corante *Wright* (Merck, Darmstadt, Alemanha) e tampão fosfato 0,06 M, respectivamente, e uma camada da mesma foi colocada sobre as lâminas durante 1 minuto e 30 segundos.

### 3.7.1.3 Técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A técnica de FISH para verificar a microdeleção de 22q11.2 no paciente T158 (que apresentou a deleção pelo MLPA) foi realizada com a sonda para a região crítica da DGS (*DiGeorge/VCFS Region Probe-Cytocell*). Essa sonda detecta deleções em 22q11.2, e foi hibridada concomitantemente com a sonda específica para a região subtelomérica do braço longo do cromossomo 22 (22qter), utilizada como controle. O procedimento foi realizado conforme protocolo recomendado pelo fabricante (*Cytocell*).

### 3.7.1.4 Análise citogenética

Para a análise citogenética, foram analisadas 20 metáfases sob bandamento G, por indivíduo. A análise foi feita em microscópio óptico Zeiss® (Oberkochen, Alemanha) em aumento de 1000x, sendo três metáfases capturadas no Sistema de Imagem de Cariótipo IKAROS (Metasystem®, Alemanha). Os cromossomos

metafásicos com resolução de 550 bandas cromossômicas foram classificados conforme descrito no *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN,2009).

### 3.7.2 Estudo molecular

#### 3.7.2.1 Extração e armazenamento de DNA

Aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados em tubo contendo anticoagulante EDTA, para a análise molecular. A partir dos linfócitos periféricos, o DNA foi extraído por meio do *kit Gentra Puregene* (Qiagen, Maryland, Estados Unidos), segundo as instruções do fabricante.

Aproximadamente 3 mL de sangue total foram adicionados em um tubo de 15 mL contendo 9 mL da solução *RBC Lysis* (Qiagen, Maryland, Estados Unidos). Após 10 minutos de incubação, os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado.

Foram adicionados 3 mL da solução *Cell Lysis* (Qiagen, Maryland, Estados Unidos) para ressuspender as células e 1 mL da solução *Protein Precipitation* (Qiagen, Maryland, Estados Unidos). Os tubos foram novamente centrifugados a 2000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi adicionado em um novo tubo de 15 mL contendo Isopropanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha). A solução foi homogeneizada e após ser centrifugada a 2000 g por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado.

Foram adicionados 3 mL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 2000 g por 1 minuto. O precipitado contendo o DNA foi seco e hidratado com 250  $\mu$ L da solução *DNA Hydration* (Qiagen, Maryland, Estados Unidos) e os tubos foram incubados a 65°C por 1 hora e depois a 37°C por 16 horas.

Em seguida, o DNA foi transferido para um tubo de 1,5 mL e quantificado por meio do NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, EUA). Uma alíquota foi diluída a 100 ng/μL e o restante foi armazenado em geladeira ou *freezer* -20°C.

### 3.7.2.2 Análise de ancestralidade

Para a análise de ancestralidade, as amostras de DNA, tanto de pacientes portadores de esquizofrenia quanto de indivíduos controles, foram aliqüotadas em 10 μL e diluídas a 20 ng/μL. As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará pelo grupo do Dr. Sidney Santos, em colaboração. Para tanto, foi utilizado um painel contendo 48 marcadores informativos de ancestralidade (Santos et al, 2010), e que permite distinguir diferentes populações, como européia, africana e nativo americana, e identificar subestrutura em populações miscigenadas. Esse painel foi composto por 16 marcadores de ancestralidade africana, 16 marcadores de ancestralidade européia e 16 marcadores de ancestralidade nativo americana.

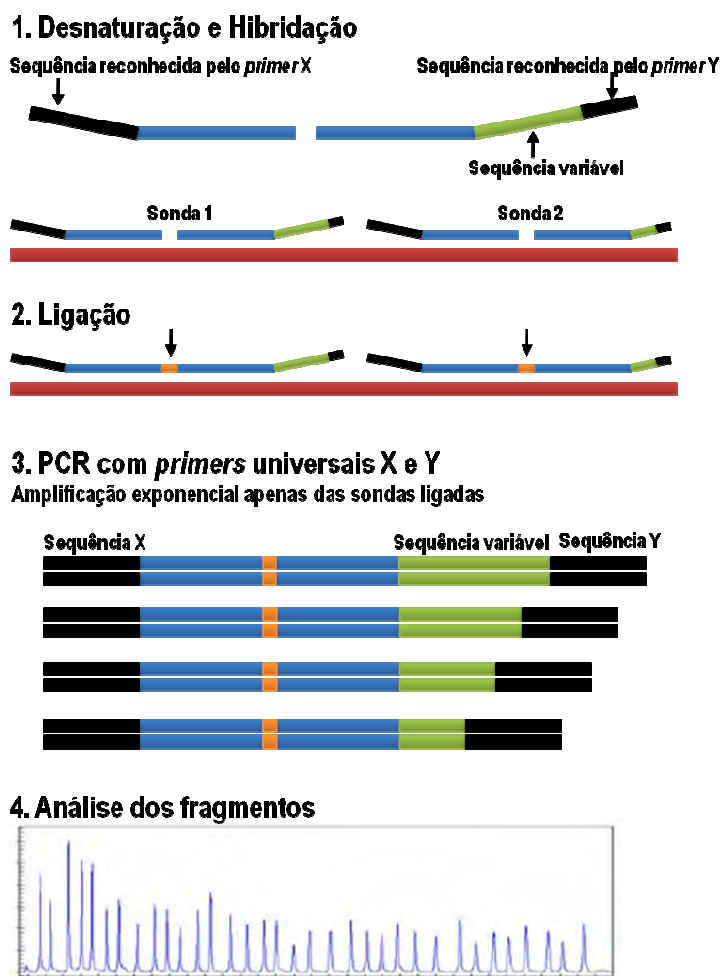
Para cada ensaio de PCR (Reação em cadeia da polimerase) *multiplex* foi realizada uma mistura com um volume de 12,5 μL contendo: Tampão de Amplificação com 3mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (1x), 125 μL de cada dNTP, 2 unidades de *AmpliTaq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), *mix* de *primers* a diferentes concentrações e 10–20 ng de DNA. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 11 minutos, 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 70°C por 2 minutos, 17 ciclos de 90°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 70°C por 2 minutos com extensão final de 60°C por 60 minutos. Em amostras contendo 1 μL do produto amplificado foram adicionados 8,5 μL de formamida (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e 0,5 μL de padrão de peso 500 liz (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os fragmentos de DNA foram separados por meio do *ABI prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e analisados com o *software GeneMapper ID v3.2*.

### 3.7.2.3 Estudo molecular por meio da técnica de MLPA

A metodologia de MLPA se baseia em uma PCR múltipla, na qual sondas adicionadas são amplificadas. Cada sonda é constituída de duas partes, as quais hibridam em locais adjacentes na sequência alvo de DNA. Cada metade possui uma sequência para um *primer* universal e uma delas é intercalada por uma sequência variável em tamanho, a qual permite distinguir as diferentes sondas (Figura 5). Dessa forma, quando é realizada a PCR, *primers* marcados com substância fluorescente são adicionados à reação, permitindo que as sondas amplificadas sejam detectadas pelo sequenciador. Assim, quando existe deleção de alguma região, a sonda não amplificará, e as regiões deletadas poderão ser identificadas ao se comparar com um controle normal. Esta é uma técnica tanto qualitativa quanto quantitativa, capaz de detectar variações no número de cópias dessas regiões, e foi realizada em colaboração com a Dra. Denise Maria Christofolini e MS Fernanda da Silva Teixeira Bellucco.

Para a técnica de MLPA, foi utilizado o *kit* DGS/VCFS (*SALSA MLPA KIT P250 DiGeorge probemix* – MRC-Holland, Amsterdã, Holanda), o qual consiste em 13 sondas para a região crítica DGS/VCFS (região crítica da 22q11DS), 5 sondas para a região crítica da síndrome *Cat Eye*, duas sondas controle do cromossomo 22 localizadas em 22q13 e 6 sondas para a segunda região crítica da síndrome de DiGeorge em 10p, além de 19 sondas específicas para regiões cromossômicas de 4q35, 8p23, 9q34.3 e 17p13.3, também relacionadas à síndrome. As sondas utilizadas nesse protocolo estão descritas no Anexo VI.

A metodologia foi constituída de três etapas principais: 1) etapa de preparação do DNA e hibridação com as sondas, 2) etapa de ligação das sondas hibridadas e 3) etapa de amplificação das sondas ligadas por PCR, de acordo com o protocolo do fabricante (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda). Essas etapas estão representadas na Figura 5.



**Figura 5 – Etapas da metodologia de MLPA.** Primeiro ocorre a desnaturação e hibridação das sondas, em seguida, as sondas são ligadas por meio de uma enzima ligase. Na terceira etapa, é realizada uma PCR para amplificação das sondas ligadas, permitindo a análise de fragmentos. Modificada de <http://www.mrc-holland.com>.

Na primeira etapa, 5  $\mu\text{L}$  de DNA, a uma concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , foram pipetados em tubos de 0,2  $\mu\text{L}$  e em seguida submetidos a uma desnaturação a 98°C por 5 minutos e resfriamento a 25°C. Nesse momento, para cada reação foi adicionada uma mistura de 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão MLPA e 1,5  $\mu\text{L}$  de *probemix*. Em seguida, os tubos foram incubados a 95°C por 1 minuto e a 60°C por 16 horas.

Na etapa de ligação, para cada reação foi preparada uma mistura contendo: 3  $\mu\text{L}$  de tampão A ligase-65, 3  $\mu\text{L}$  de tampão B ligase-65, 25  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  de ligase-65. Quando as amostras estavam a 54°C, 32  $\mu\text{L}$  dessa mistura foram adicionados a cada tubo. Em seguida, os tubos foram incubados a 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e mantidos a 4°C.

Na terceira etapa, 10  $\mu\text{L}$  do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo de 0,2  $\mu\text{L}$  contendo uma mistura de 4  $\mu\text{L}$  de tampão SALSA PCR e 26  $\mu\text{L}$  de água e colocados em termociclador a 72°C. Em cada tubo, foi adicionada uma nova mistura contendo: 2  $\mu\text{L}$  de *primers* SALSA, 2  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição da enzima SALSA, 5,5  $\mu\text{L}$  de água e 0,5  $\mu\text{L}$  de SALSA polimerase. Em seguida, os tubos foram submetidos a uma PCR com o seguinte programa: 95°C por 30 segundos, 11 ciclos de 72°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, 95°C por 30 segundos, seguidos de 27 ciclos a 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 20 segundos.

Para a análise dos fragmentos, foram pipetados em uma placa de sequenciamento: 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR, 0,2  $\mu\text{L}$  de padrão de peso 500 liz e 8,8  $\mu\text{L}$  de formamida. Então as amostras foram desnaturadas a 98°C por 5 minutos, resfriadas por 3 minutos em *freezer* e analisadas em sequenciador *ABI prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP. Os resultados gerados foram analisados por meio do *software GeneMarker* (SoftGenetics, EUA).

#### 3.7.2.4 Determinação dos genótipos do gene *UFD1L*

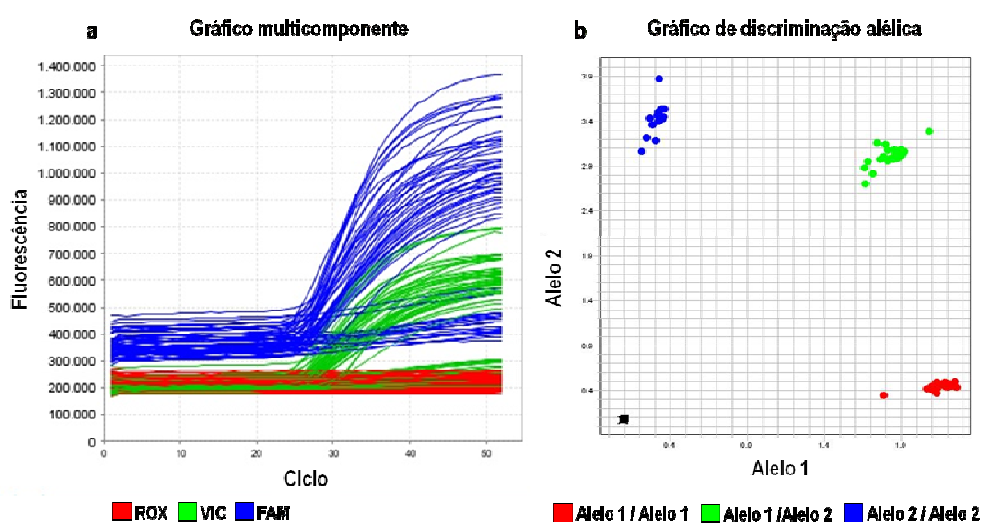
Foram estudados três polimorfismos do gene *UFD1L*: rs5992403 (A/G), rs5746744 (G/C) e rs1547931 (G/C). O primeiro foi analisado pela metodologia de PCR em tempo real com sistema de detecção *Taqman*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e os outros dois pela metodologia de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

#### Polimorfismo rs5992403

A metodologia de PCR em tempo real com sistema de detecção *Taqman*<sup>®</sup> se baseia na confecção de *primers* específicos para a região estudada (*forward* e *reverse*) e de uma sonda para o alelo selvagem, marcada com um



fluorocromo VIC, e uma sonda para o alelo polimórfico, marcada com o fluorocromo FAM (6-carboxy-fluorescein). O DNA é desnaturado e ocorre a ligação da sonda correspondente ao DNA (mutado ou selvagem). Ocorre, então, a ligação dos *primers* que iniciam a polimerização da região e ao encontrar a sonda (já hibridada) há liberação do fluorocromo, gerando assim, um sinal que será captado pelo equipamento, identificando o alelo presente. Dessa forma, os resultados são dados pela presença ou ausência da amplificação de cada alelo, como mostra a Figura 6a. As amostras são então genotipadas e colocadas em um gráfico que as separa em *clusters* dos diferentes genótipos (Figura 6b).



**Figura 6 – Gráficos obtidos com a PCR em Tempo Real com sistema TaqMan.** a) Amplificação dos alelos marcados com VIC (em verde) e com FAM (em azul) em diferentes amostras. A fluorescência passiva utilizada foi o ROX (em vermelho). b) Gráfico mostrando os *clusters* de genótipos: amostras de homocigotos para o alelo 1 em vermelho, amostras de heterocigotos em verde e amostras de homocigotos para o alelo 2 em azul.

Para o polimorfismo rs5992403, o ensaio utilizado (C\_27846845\_10) foi composto por *primers* e sondas específicas, sendo que a complementar ao alelo G foi marcada com fluorocromo VIC, e a para o alelo A foi marcada com fluorocromo FAM. As sequências das sondas utilizadas foram: 5'-ACGTAATTTAAATAACGTTTAAA[A/G]TACCTATAAAAGGGGAAATAAATCA-3'.

O volume final da PCR foi de 12,5  $\mu$ L, utilizando 6,25  $\mu$ L de *master mix* para genotipagem (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*), 0,31  $\mu$ L de *mix* de

sondas e *primers* (40x), 5,44 µL de água e 0,5 µL de DNA (contendo de 1-20ng). As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação a 95°C por 3 minutos e 50 ciclos de 3 minutos de desnaturação a 95°C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 60°C.

### Polimorfismo rs5746744

A metodologia de RFLP se baseia na amplificação de uma sequência, seguida de uma fragmentação desse produto por uma enzima de restrição que reconhece um sítio específico que contém o polimorfismo. A presença de fragmentos de tamanhos diferentes indica o genótipo de cada indivíduo.

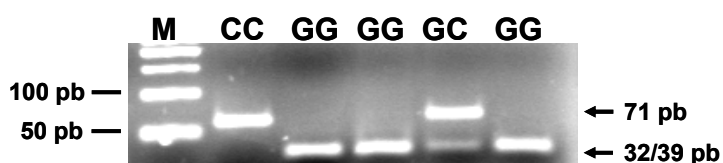
Dessa forma, foram desenhados *primers* através dos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net/>) e as condições foram avaliadas pelo programa *OligoAnalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). As enzimas a serem utilizadas foram selecionadas por meio do programa *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Assim, os *primers* utilizados para a PCR do polimorfismo rs5746744 foram: 5'-CCTGTGACCCAGGTTCTCC-3' (*forward*) e 5'-CCTTTGTCAGCATCTGGTTG-3' (*reverse*). A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 1,5 µL de Tampão de Amplificação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10x), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L), 0,6 µL de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 1 unidade de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 0,6 µL de cada *primer* (10 µmol/L) e 100 ng de DNA em volume final de 15,2 µL. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, os produtos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Para a digestão enzimática foram utilizados: 10,0 µL de produto de PCR, 2,0 µL de tampão *Fast*, 17 µL de água e 1,0 µL de enzima *MvaI Fast* (Fermentas, União Européia). A digestão foi realizada por 10 minutos a 37°C. A distribuição dos

fragmentos foi analisada por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (Figura 7).

O produto de PCR gerado apresentou 71 pb. A presença do alelo G gerou um sítio de restrição para a enzima *Mva*I, originando dois fragmentos: um de 32 pb e outro de 39 pb. Por outro lado, o alelo C não possui sítio de restrição para essa enzima, mantendo o fragmento de 71 pb. Assim, após a reação de digestão, os fragmentos identificados foram: genótipo CC: 71 pb; genótipo GG: 32 e 39 pb; e genótipo GC: 71, 32 e 39 pb. Apesar da resolução do gel de agarose não permitir a diferenciação das bandas de 32 pb e 39 pb, a genotipagem das amostras foi possível. A distribuição de bandas para esse polimorfismo está representada na Figura 7.



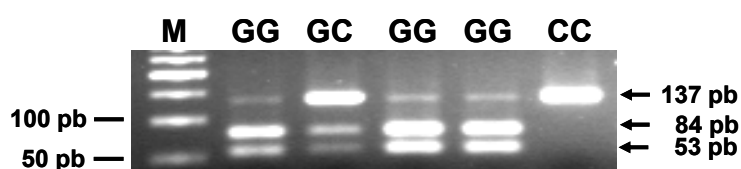
**Figura 7 – Gel de agarose 3% após a digestão com a enzima *Mva*I para o polimorfismo rs5746744.** Indivíduos com o genótipo CC apresentam apenas a banda de 71 pares de bases (pb), os com genótipo GG, as de 32 e 39 pb. Já os heterozigotos GC apresentam as bandas de 71, 39 e 32 pb. M: Marcador de peso molecular de 50 pb (*New England Biolabs*, EUA).

### Polimorfismo rs1547931

O polimorfismo rs1547931 do gene *UFD1L* também foi genotipado pela metodologia de RFLP. Dessa forma, os *primers* utilizados para a PCR foram: 5'-GCACTCCCTCCTATCACCAA-3' (*forward*) e 5'-GCTGAGCCCAGTCCAGTTTA-3' (*reverse*). A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 1,5 µL de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L), 0,6 µL de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 1 unidade de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 0,6 µL de cada *primer* (10 µmol/L) e 100 ng de DNA em volume final de 15,2 µL. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, os produtos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Para a digestão enzimática foram utilizados: 10,0  $\mu\text{L}$  de produto de PCR, 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão *Fast*, 17  $\mu\text{L}$  de água e 1,0  $\mu\text{L}$  de enzima *PstI Fast* (Fermentas, União Européia). A digestão foi realizada por 10 minutos a 37°C. A distribuição dos fragmentos foi analisada por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (Figura 8).

O produto de PCR gerado apresentou 137 pb. A presença do alelo G gerou um sítio de restrição para a enzima *PstI*, originando dois fragmentos: um de 84 pb e outro de 53 pb. Por outro lado, o alelo C não possui sítio de restrição para essa enzima, mantendo o fragmento de 137 pb. Assim, após a reação de digestão, os fragmentos identificados foram: genótipo CC: 137 pb; genótipo GG: 84 e 53 pb; e genótipo GC: 137, 84 e 53 pb. A distribuição de bandas para esse polimorfismo está representada na Figura 8.



**Figura 8 – Gel de agarose 3% após a digestão com a enzima *PstI Fast* para o polimorfismo rs1547931.** Indivíduos com o genótipo CC apresentam apenas a banda de 137 pares de bases (pb), os com genótipo GG, as de 84 e 53 pb. Já os heterozigotos GC apresentam as bandas de 137, 84 e 53 pb. M: Marcador de peso molecular de 50 pb (*New England Biolabs*, EUA).

### 3.7.2.5 Determinação dos genótipos do gene *ZDHHC8*

O polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* foi genotipado por PCR em tempo real utilizando o Ensaio *Taqman* SNP Genotyping® (C\_25768026\_10), previamente descrito. As sequências das sondas utilizadas foram: 5'-AGGTGGCCGTCCCTAGGTTGGGAGG[A/G]GGTTTGTCCACAGGCACCTGCTCTG-3', sendo que a sonda contendo o alelo A foi marcada com fluorocromo VIC e a com o alelo G foi marcada com fluorocromo FAM. O volume final da PCR foi de 12,5  $\mu\text{L}$ , utilizando 6,25  $\mu\text{L}$  de *master mix* para genotipagem (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), 0,31  $\mu\text{L}$  de *mix* de sondas e *primers* (40x), 5,44  $\mu\text{L}$  de água e 0,5  $\mu\text{L}$  de DNA

(contendo de 1-20ng). As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação a 95°C por 3 minutos e 50 ciclos de 3 minutos de desnaturação a 95°C e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 60°C.

### 3.7.2.6 Sequenciamento do gene *TBX1*

Dez pacientes com fenótipo típico da 22q11DS, mas sem a deleção avaliada por citogenética e MLPA, foram selecionados para a análise de variantes gênicas por meio do sequenciamento direto de 11 éxons, incluindo 9A, 9B e 9C, abrangendo, assim, as três isoformas do gene *TBX1*. Anteriormente ao sequenciamento, os éxons foram amplificados, sendo que as sequências dos *primers* estão representadas na Tabela 2. Para os éxons 3 e 9C foram construídos dois pares de *primers*, uma vez que eram fragmentos muito grandes para sequenciados.

**Tabela 2 – *Primers* utilizados para a amplificação de éxons do gene *TBX1* e os tamanhos dos fragmentos amplificados.**

Éxon	<i>Primer foward</i>	<i>Primer reverse</i>	Tamanho do fragmento
Éxon 1	5'-GAGCAGATGTCTCAGCCCAG-3'(*)	5'-CCACACTCCTCTTCACCTGC-3'(*)	344pb
Éxon 2	5'-GCTGGGCACACGCAGTCG-3'	5'-CCACACTCCTCTTCACCTGC-3'(*)	330pb
Éxon 3	5'-ACGCAGCTCTCGCATTTC-3'	5'-CTGGTTGAACTCGTCCCACA-3'	372pb
	5'-GTGAAGAAGAACGCGAAGGT-3'	5'-GCGGAGGATAGGTGTTAGGA-3'	326pb
Éxon 4	5'-GCTAAGCCAGGAAAGATGGAG-3'(*)	5'-TCGCAGGTGCCTAAAGAGTT-3'	376pb
Éxon 5	5'-CAGAGGGTTCAATCTCACAGG-3'(*)	5'-CTCTTAGGGACAGGCGGTT-3'	369pb
Éxon 6	5'-CATTGCCAACTCAGACCTCAG-3'(*)	5'-GTCTAAGCGGACCCACTGTC-3'	349pb
Éxon 7	5'-GCAGACGTGGACTGGTTCTT-3'	5'-CTACCTTTCTCCGTGCCG-3'	387pb
Éxon 8	5'-GCAGACGTGGACTGGTTCTT-3'	5'-GCGGAGAGAAGGCTCTTG-3'	694pb
Éxon 9A	5'-TCAGACACTGGACATTTGTGC-3'(*)	5'-ACTGGGAGTGTGACTCTATGGA-3'(*)	453pb
Éxon 9B	5'-GATGGTGTGTGAGGCTGATG-3'	5'-AGGATTCGCTTCCATCACAG-3'	394pb
Éxon 9C	5'-GACTGGTCGGGGAACACC-3'(*)	5'-GTATTCCTTGCTTGCCCTTG-3'	592pb
	5'-CCGCCTACGACCACTATCTC-3'	5'-CTTCCAAAAGAGGCGAAACC-3'	420pb

(\*): Desenho dos *primers* fornecidos por Zweier et al (2007).

### Éxon 1

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### Éxon 2

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2  $\mu$ L de DMSO, 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### Éxon 3

Não foi possível padronizar a PCR para o primeiro fragmento. Para o segundo fragmento, a PCR foi realizada com *primers* que flanqueiam uma região de 326 pb e foram utilizados os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, a

amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### Éxon 4

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### Éxon 5

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### Éxon 6

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 62°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a

PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### Éxon 7

A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60,7°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### Éxon 8

Não foi possível padronizar a PCR para o éxon 8 por dificuldades técnicas.

### Éxons 9A, 9B e 9C

O éxon 9 varia em três isoformas, sendo elas 9A, 9B e 9C. Os reagentes e condições da PCR foram os mesmos para os éxons 9A e 9B: 5  $\mu$ L de Tampão de Amplificação com KCl (10x), 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L de dNTP (contendo 2,5 mmol/L de cada um), 2 unidades de *Taq polymerase* (Fermentas, União Européia), 2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L) e 300 ng de DNA em volume final de 50  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, a amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Não foi possível padronizar a PCR para o éxon 9C.

A análise de mutações do gene *TBX1* foi realizada pela metodologia de sequenciamento de DNA. Para tanto, foi realizada uma PCR, descrita acima, e os



produtos de amplificação foram purificados com o *kit HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction (Real Biotech Corporation, Banqiao, Taiwan)*.

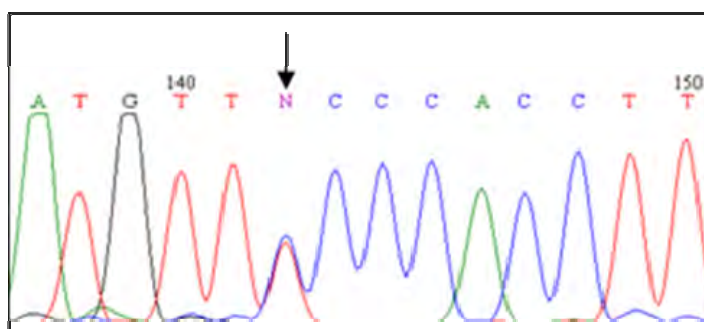
Nesse protocolo, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de produto de PCR em tubos contendo 200  $\mu\text{L}$  de *DF Buffer (Real Biotech Corporation, Banqiao, Taiwan)*. A mistura foi transferida para uma coluna, a qual foi centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi desprezado e 600  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer (Real Biotech Corporation, Banqiao, Taiwan)* foram pipetados na coluna. Após uma nova centrifugação a 13000 rpm por 4 minutos, o filtrado foi desprezado e a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Para eluir o DNA, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de *Elution Buffer (Real Biotech Corporation, Banqiao, Taiwan)* e após 2 minutos, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. O DNA eluído foi aplicado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para verificar se a quantidade de DNA era adequada para o sequenciamento.

O sequenciamento direto dos produtos de PCR foi realizado para ambas as fitas, usando o método dideoxy de terminação de cadeia (*BigDye™ Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction kit - Applied Biosystems, Foster City, EUA*) segundo as instruções do fabricante. Para tanto, foi preparada uma mistura contendo 1  $\mu\text{L}$  de *Big Dye v.3.1. (2,5x)* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 1  $\mu\text{L}$  de *primer forward* ou *reverse* (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de Tampão *Big Dye* (5x), 13  $\mu\text{L}$  de água e 2  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR purificados, totalizando 20  $\mu\text{L}$  de reação.

As amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: 95°C por 2 minutos, 26 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Em seguida, para cada reação foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e 1  $\mu\text{L}$  de Acetato de sódio 3 mol/L. Após 15 minutos de incubação, a placa foi centrifugada a 2000 g por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados em cada tubo. A placa foi centrifugada a 2000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Após a placa ficar seca, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de formamida (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e foi iniciada a desnaturação a 98°C por 5

minutos. A placa foi resfriada por 3 minutos em *freezer* e analisadas em sequenciador *ABI prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP. Os eletroferogramas gerados por meio do *software* BioEDIT (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Figura 9) foram comparados com seqüências nucleotídicas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) com o *software* CLC *Sequence Viewer* (<http://www.clcbio.com/index.php?id=28>).



**Figura 9 – Eletroferograma do sequenciamento do éxon 4 do gene *TBX1*, indicando a presença de heterozigose.** Observa-se um pico do alelo C e outro pico do alelo T na mesma posição. Com o banco de dados do *Ensembl* foi possível identificar que se tratava do polimorfismo rs41298814.

### 3.8 Análise de CNVs pela metodologia de *array*

Para a análise de CNVs foi utilizada a metodologia de microarranjos de DNA (*Genome-Wide Human SNP array 6.0* – Affymetrix, Santa Clara, EUA). Previamente, foram preparados três *pools* de amostras de DNA: 1) *Pool* SP: pacientes com esquizofrenia provenientes de São Paulo (141 amostras); 2) *Pool* SP REP: replicata do *pool* SP (138 amostras); e 3) *Pool* RS: pacientes provenientes do Rio Grande do Sul (74 amostras). O *pool* SP REP foi preparado posteriormente para replicata técnica, no entanto, por falta de material biológico, foi utilizado um número menor de amostras, quando comparado ao *pool* SP. A partir das amostras incluídas no *pool* SP REP, foram preparados outros *pools* subdividido-o em três partes contendo 48 amostras em cada (SP REP-A, SP REP-B e SP REP-C).

Para tanto, cada *pool* foi diluído para uma concentração de 100 ng/ $\mu$ L e quantificado em triplicata por meio do NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). Em seguida, os *pools* foram diluídos para uma concentração de 50 ng/ $\mu$ L. A técnica de *Genome-Wide Human SNP array 6.0* (Affymetrix, Santa Clara, EUA) foi realizada em colaboração com a MS Renata Pellegrino da Silva, utilizando a plataforma da Affymetrix do Laboratório *Molecular Core* da AFIP (Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa).

### 3.8.1 Fluxo experimental do *GeneChip array 6.0* Affymetrix

Os experimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante (*Affymetrix<sup>®</sup> Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 User Guide e SNP 6.0 Protocol – Quick reference guide*, 2009). Os *arrays* utilizados contêm oligos pré-sintetizados de 25 mers (bases) ligados a uma superfície de quartzo (*Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0*, Affymetrix, Santa Clara, EUA). Tais *arrays* contêm milhões de sondas representando cerca de um milhão de SNPs e 946.000 sondas para a detecção de CNVs, separados por uma distância média de 700 pb.

A parte experimental da metodologia está esquematizada na Figura 10. A primeira etapa é caracterizada por digestões de aproximadamente 250 ng de DNA com a enzima *StyI* e 250 ng de DNA com a enzima *NspI* para formação de cortes coesivos ao longo do DNA (tubos distintos). Posteriormente, os fragmentos foram submetidos a uma etapa denominada de ligação com a enzima DNA T4 DNA ligase. A reação promove a interação de uma molécula denominada “adaptador” que se liga às extremidades coesivas e direciona os *primers* (randômicos) durante a próxima etapa de amplificação. A amplificação é feita em triplicata para as amostras com cortes de *StyI* e quaduplicatas para a enzima *NspI*. Após a etapa de amplificação, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% para verificar o padrão de distribuição dos produtos das PCRs, que deve estar entre 200 pb e 1100 pb (Figura 11a).

Uma vez que a distribuição da amplificação esteja no padrão esperado, os produtos de PCR de cada digestão com as duas enzimas foram