



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDOS CLÍNICOS E MOLECULARES EM FAMÍLIAS COM
DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LIGADA AO CROMOSSOMO X**

Danyllo Felipe de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Co-orientadora: Dr.^a Gabriela Ferraz Leal

Recife, 2014

Danyllo Felipe de Oliveira

**ESTUDOS CLÍNICOS E MOLECULARES EM FAMÍLIAS COM
DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LIGADA AO CROMOSSOMO X**

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Co-orientadora: Dr.^a Gabriela Ferraz Leal

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Recife, 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Danyllo Felipe de
Estudos clínicos e moleculares em famílias com deficiência intelectual
ligada ao cromossomo X/ – Recife: O Autor, 2014.

86 folhas : il., fig., tab.

Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

Coorientadora: Gabriela Leal Ferraz

Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências
Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1.Síndrome de fragilidade do cromossomo X 2. Incapacidade
intelectual I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (orientador) II.
Ferraz, Gabriela Leal (coorientadora) III. Título

611.018167

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 284

Danyllo Felipe de Oliveira

**ESTUDOS CLÍNICOS E MOLECULARES EM FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA
INTELECTUAL LIGADA AO CROMOSSOMO X**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Data da aprovação 28/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira
(Departamento de Neuropsiquiatria – Centro de Ciências da Saúde - UFPE)
Orientador

Profª Drª Neide Santos
(Departamento de Genética – Centro de Ciências Biológicas - UFPE)

Prof. Dr. Carlos Henrique Madeiros Castelletti
(Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE)

Membros Suplentes:

Profª. Drª Danyelly Bruneska Gondim Martins (Departamento de Bioquímica – UFPE)
Drª Roberta Rodrigues de Lemos (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami -UFPE)

Recife, 2014

Agradecimentos

Ao Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira e à Dra. Gabriela Ferraz Leal pela confiança, amizade e pela orientação durante esse mestrado. Seus exemplos como profissionais sempre dispostos a produzir Ciência de um modo responsável, ético e rigoroso têm sido inspiradores para mim. Exemplos que pretendo guardar para a vida inteira.

À Dra. Ângela Maria Vianna Morgante, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por tão bem ter me recebido em seu laboratório durante o período em que passei sob sua supervisão naquela instituição.

Ao Dr José Oliveira dos Santos, Silvia Costa, Fátima Caly, Maraísa e Mara, membros do laboratório de Genética Humana da USP, pelo apoio e colaboração no estudo molecular que envolveu parte do meu trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório do LIKA (Eriton, Joana, Lylyan, Regina, Roberta, Ighu, Matt, Tainá, Livia e Aline) pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos amigos e colegas do curso de mestrado em Ciências Biológicas da UFPE, pela amizade e apoio durante este período.

Às famílias dos pacientes estudados nesse trabalho, por tão prontamente terem aceitado participar desse trabalho e colaborarem com este.

Aos meus familiares e amigos, que sempre têm me oferecido apoio nos momentos difíceis, compreensão nas ausências e paciência durante as discussões sobre o tema da pesquisa. Sem vocês esse percurso não teria sido tão prazeroso!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento dos meus trabalhos através do fornecimento da bolsa de estudos.

RESUMO

Entende-se por Deficiência Intelectual (DI), conforme a mais recente versão do Código Internacional de Doenças (CID-10), como sendo uma “parada do desenvolvimento ou desenvolvimento incompleto do funcionamento intelectual”. Essa alteração se dá essencialmente durante o desenvolvimento do indivíduo e afeta, principalmente, “funções cognitivas, de linguagem, motricidade e do comportamento social”. Ainda segundo as definições teóricas do CID-10, a DI pode ser subdividida de acordo com o grau de severidade de comprometimento intelectual, sendo este medido pelo nível do quociente de inteligência (QI) obtido dos pacientes em testes de neuropsicologia. A deficiência intelectual é uma característica bastante recorrente, e tem sido extensivamente estudada do ponto de vista genético desde a identificação da trissomia do cromossomo 21 como um fator etiológico para a Síndrome de Down. Posteriores investigações usando técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ*, contribuíram para melhor compreender a base molecular da DI, através da descrição de perdas e ganhos de grandes fragmentos cromossômicos além de microdeleções e microduplicações. Estas alterações têm sido crescentemente descritas para a Síndrome de *Cri Du Chat*, Smith-Magenis, Wolf-Hirschhorn, entre outras. Dentre as condições genéticas onde DI é encontrada, as cujo padrão de herança está ligado ao cromossomo X representam de 10 a 15 % dos casos. Em face disso, a deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X (DMLX) apresenta-se como um complexo grupo de mais de mais de 200 entidades nosológicas, com uma considerável heterogeneidade genética, uma vez que mais de 100 genes têm sido identificados até o momento. Entretanto, a despeito da grande quantidade de genes envolvidos, mais de 50 % das famílias identificadas com deficiência mental ligada ao X possuem uma etiologia genética desconhecida. Duas famílias com um provável padrão de herança ligada ao cromossomo X, originárias do Estado de Pernambuco foram avaliadas do ponto de vista clínico e molecular. A família 1 apresentou quatro afetados, sendo três homens e uma mulher, que eram portadores de deficiência mental grave. O indivíduo probando, cuja idade é 29 anos, apresenta além da DI, um perímetro cefálico abaixo do segundo percentil. Nenhuma outra alteração dismórfica foi evidenciada nos outros indivíduos, embora entre os afetados haja o registro de crises convulsivas. A segunda família, com três afetados, sendo dois deles gêmeos univitelinos, apresenta indivíduos com deficiência intelectual grave, com nenhum outro sinal dismórfico aparente. A análise por *Southern blotting* de ambas famílias para a verificação das expansões do gene FMR1, associado à síndrome do cromossomo X frágil, revelou que o probando da família 1 apresentava a pré-mutação (fragmentos de 3 kb), assim como a sua genitora e a irmã desta. O outro afetado, filho desta última portadora da pré-mutação, apresentou a mutação completa (fragmentos de 6, 6,3 e 8kb). O último indivíduo afetado e sua respectiva genitora apresentaram fragmentos correspondentes ao de indivíduos normais (2,8 e 5,2 kb). Tais dados levam ao diagnóstico da Síndrome do cromossomo X frágil para a primeira família. A segunda família foi semelhantemente testada, mas os indivíduos e sua genitora são normais para o teste do gene FMR1. O estudo do teste de desvio de inativação do cromossomo X na mãe dos afetados da família 2 revelou que este indivíduo apresenta um desvio total de inativação (100:0), um indicativo do padrão de herança ligada ao cromossomo X. A hibridização genômica comparativa (array CGH) não identificou nenhuma alteração cromossômica microestrutural que pudesse explicar o fenótipo.

Palavras-chave: Deficiência intelectual, cromossomo X, desvio de inativação, Síndrome do cromossomo X frágil, array CGH.

ABSTRACT:

Intellectual disability (ID), according to the most recent version of the International Code of Diseases (ICD-10), is a “halt in the development or na incomplete development of intellectual functioning”. This alteration takes place during development and affects mostly “cognitive functioning, language, motricity and social behaviour”. Still, according to the theoretical definitions of ICD – 10, ID can be classified regarding the severity of intellectual impairment. It can be attained through the intelligence quotient (IQ) test, obtained from patients in neuropsychology assessments. Intellectual disability is a very common phenotype, and has been studied extensively from a genetic perspective, since the identification of chromosome 21 trysomy as the etiological factor for Down Syndrome. Futher investigations using cytogenetic tools such as chromosome banding and *in situ* hybridization, have contributed to better understand the molecular basis of ID, through the identification of gains and losses of large chromosomal fragments, microdeletions and microduplications. These alterations have been increasingly described, for instance, in Cri Du Chat, Smith-Magenis, Wolf-Hischhorn syndromes. Among the genetic conditions where ID is found, those ones whose the pattern of inheritance is X – linked account for 10 to 15% of the identified cases. X linked intellectual disability (XLID) is a complex group of more than 200 nosological entities, with an important genetic heterogeneity, once that, to date, more than 100 genes have been identified to these disorders . However, in spite of the big amount of involved genes, more than 50% of the identified families with XLID have their genetic bases unidentified. Two families with a probable pattern of inheritance linked to X chromosome were evaluated clinically and molecularly. The family 1 presented 4 affected individuals, three men and a woman, carrying severe ID. The propositus, a 29-years-old man, shows besides ID, a head circumference below the second percentile. No other dysmorphic alteration has been evidenced in the other individuals, although there is record of seizures among these individuals. The second family, with three affected males, two of them monozygotic twins, shows individuals with severe intellectual disability with no other aparent dysmorphic feature. *Southern blotting* analysis in both families aiming to assess the FMR1 expansions was performed. This analysis showed that the propositus from family 1 carries a premutation allele (3 kb fragments) and so did his mother and her sister. The other affected individual, who is cousin of the propositus and son of the last premutation carrier, presented the full mutation (6 , 6,3 and 8kb fragments). The last affected individual and her mother showed normal fragments (2,8 e 5,2 kb). Such findings lead us confirm X fragile syndrome for one individual (full mutation carrier), with the other affected individuals probably being phenocopies of even mosaics. Similarly, the family 2 was tested for FMR1, but the individuals showed normal alleles only (2,8 and 5,2 kb). The X chromosome inactivation skewing testing in the mother of the affected boys showed that this woman presents a totally skewed pattern of inactivation (100:0), a data that evidences X linked inheritance. Comparative genome hybridization was also performed using the propositus’ sample. This analysis did not find any microstructural alteration that could explain the phenotype.

Key words: Intellectual disability, X chromosome, inactivation skewing, Fragile X Chromosome Syndrome, array CGH

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1:** Os diagramas acima demonstram os principais eventos de recombinação que ocasionam variações de números de cópias no genoma humano.....35
- Figura 2:** Representação esquemática do cromossomo X humano com alguns genes associados a formas sindômicas e não sindrômicas de deficiência mental.44
- Figura 3:** Diagrama representando o estudo dos cromossomos X de fêmeas cuja inativação do cromossomo X é aleatória e enviesada. Como as enzimas *HhaI* e *HpaII* apenas digerem os fragmentos desmetilados, em casos de desvio de inativação haverá um desequilíbrio na amplificação dos alelos, notada através da eletroforese em gel de acrilamida.46
- Figura 4:** Ilustração das formas normal, pré-mutada e mutada do gene FMR1.48

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: An esquematic representation of the heredogram of the family 1, showing four affected individuals and a high degree of clinical heterogeneity. 68

Figure 2: The depicted heredogram presents a three-affected-individuals family, with no other clinical findings but mental deficiency. 69

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Diferentes sistemas de classificação de casos de deficiência intelectual	22
Tabela 2: Tipos de deficiência intelectual classificados de acordo com a Severidade do transtorno	24
Tabela 3: Genes associados a famílias cujo padrão de herança da deficiência mental é autossômico recessivo	40

LISTA DE ABREVIATURAS

a-CGH : Hibridização genômica comparativa, do inglês: *Array Comparative Genomic Hybridization*

CID 10: Código Internacional de Doenças 10

CNV: Variação do Número de Cópias, do inglês: *Copy Number Variations*

DI: Deficiência Intelectual

DM: Deficiência Mental

DILX: Deficiência Intelectual Ligada ao Cromossomo X

DMLX: Deficiência Mental Ligada ao Cromossomo X

DSB: Quebras de Fita Dupla, do inglês: *Double Strand Break*

FISH: Hibridização in situ Fluorescente, do inglês: *Fluorescent In Situ Hybridization*

FoSTeS: Parada na Forquilha e Mudança de Molde, do inglês: *Fork Stalling and Template Switching*

FXTAS: Síndrome de Ataxia e Tremor Associada ao X, do inglês: *Fragile X Associated Tremor and Atxia Syndrome*

LCRs: Repetições de Baixo Número de Cópias, do inglês: *Low Copy Repeats*

LINE: Elementos Nucleares Longos e Intercalados, do inglês: *Long Interspersed Nuclear Elements*

MMEJ: Junção de Pontas Mediada por Micro – homologia, do inglês: *Microhomology-Mediated End Joining*

NAHR: Recombinação Homóloga não Alélica, do inglês: *Non-Allelic Homologous Recombination*

NLHB: Instituto Nacional do Pulmão, Coração e Sangue, Universidade de Washington, do inglês: *National Lung, Heart and Blood Institute, University of Washington*

OMIM: Herança Mendeliana em Seres Humanos Online, do inglês: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS: Organização Mundial da Saúde

QI: Quociente de Inteligência

SD: Síndrome de Down

SINE: Elementos Nucleares Curtos e Intercalados, do inglês: *Short Interspersed Nuclear Elements*

SP: Síndrome de Patau

SSM: Síndrome de Smith-Magenis

SWH: Síndrome de Wolf-Hishhorn

SXF: Síndrome do X Frágil

TAP: Repetições Associadas a Telômeros, do inglês: *Telomere Associated Repeats*

WAIS-R: Escala de Inteligência Weichsler para Adultos – Revisada, do inglês: *Weichsler Adult Intelligence Scale Reviewed*

WISC – R: Escala de Inteligência Weichsler para Crianças - Revisada, do inglês: *Weichsler Intelligence Scale For Children Reviewed*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 A inteligência humana em seus estados normal e patológico	16
3.2 Deficiência intelectual: aspectos clínicos, etiológicos e classificação	19
3.3 A arquitetura genética da deficiência intelectual	24
3.3.1 Alterações cromossômicas numéricas	25
3.3.2 Alterações cromossômicas estruturais	26
3.3.3 Síndromes de microduplicação e microdeleção	32
3.3.4 Formas autossômicas de deficiência mental	38
3.3.5 Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X	40
3.3.5.1 Inativação do cromossomo X e deficiência intelectual	45
3.3.5.2 Síndrome do Cromossomo X Frágil	47
4 BIBLIOGRAFIA	50
5 PUBLICAÇÃO: artigo a ser considerado para publicação na revista <i>Arquivos de Neuro-psiquiatria</i>: Clinical and Molecular Studies in Two Families with X Linked Intellectual Disability.....	57
6 CONCLUSÃO	70
7 ANEXOS	71

7.1 Anexo 1: Normas da Arquivos em Neuropsiquiatria.....	72
7.2 Anexo 2: Comprovação de submissão para publicação.....	73
7.3 Anexo 3: Artigo 1 publicado no <i>Hypertension Research</i> : - Exaggerated blood pressure response during exercise treadmill testing: functional and hemodynamic features, and risk factors.....	74
7.4 Anexo 4: Artigo 2 publicado no <i>Journal of Molecular Neuroscience</i> - Revisiting the M235T polymorphism position for the AGT gene and reporting a modifying variant in the Brazilian population with potential cardiac and neural impact	75
7.5 Anexo 5: Artigo 3 publicado no <i>Frontiers in Human Neuroscience</i> : Mutations at the SLC20A2 gene and brain resilience in families with idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's Disease).....	76
7.6 Anexo 6: Artigo 4 publicado no <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i> : Exaggerated blood pressure response during the exercise treadmill testing as a risk factor for hypertension.....	77

1. INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) compreende um espectro amplo de alterações que interrompem ou danificam o processo do desenvolvimento dos processos intelectivos em seres humanos. Essas alterações têm uma etiologia extremamente variada, e pode ser resultado de interferências ambientais ou alterações genéticas. O próprio conceito de deficiência intelectual pode variar, por exemplo, quando se leva em consideração fatores culturais e sociais. Por tais razões, as metodologias utilizadas por especialistas para classificar os níveis de inteligência em seres humanos ainda são temas de debates. Estima-se que, em países Ocidentais, de 1% a 3% da população padece dessa condição debilitante. O custo associado ao cuidado e acompanhamento médico desses indivíduos ao longo de suas vidas tem sido avaliado em torno de 50 bilhões de dólares nos Estados Unidos (ELLISON *et al.*, 2013; DALGALARRONDO, 2000).

Dentre as causas de DI, as de origem genética possuem uma grande variedade de mecanismos de herança e de alterações gênicas e cromossômicas associadas. Alterações esporádicas associadas a rearranjos cromossômicos ou aneuploidias foram as primeiras classes de etiologias identificadas em uma série de condições que, em conjunto, compreendem uma grande proporção das condições associadas a DI. Dentre essas alterações, a Síndrome de Down é a maior causa de DI por alteração cromossômica (COLLINS *et al.*, 2002). Outras classes de alterações, envolvendo rearranjos cromossômicos crípticos que não são detectáveis por técnicas citogenéticas convencionais, também têm sido crescentemente identificadas através da hibridização genômica comparativa (array CGH ou aCGH). Atualmente sabe-se que cerca de 5% dos pacientes com DI e malformações congênitas são portadores de uma subclasse de tais alterações crípticas chamada de rearranjos subteloméricos (VISSERS *et al.*, 2010).

As formas monogênicas de deficiência intelectual, muitas vezes associadas a populações com padrões populacionais destacáveis, como baixa heterozigose e alta taxa de endogamia, têm sido amplamente investigadas, de modo que, atualmente, há cerca de 80 genes com uma provável associação a tais formas de DI. Entretanto, devido à raridade das famílias e à extrema heterogeneidade genética desse fenótipo, a replicação desses estudos em outras famílias torna-se um grande desafio para o estabelecimento de uma relação de casualidade entre os genes candidatos e a DI (MUSANTE e ROPERS, 2014).

Dentro desse panorama, a deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (DILX) compreende um grupo extenso de enfermidades caracterizadas pela alta heterogeneidade genética,

alélica e clínica, além de apresentare uma alta incidência, se comparada com as outras dormas de DI. Isso se deve ao fato de 10 a 15% dos casos de DI são causados por alterações no cromossomo X. Dentre estes, a forma mais comum é a Síndrome do X frágil, que é a deficiência intelectual herdada mais frequente em populações humanas. A pesquisa em DILX tem sido marcada pelo rápido avanço na identificação da etiologia molecular: atualmente cerca de 100 genes desse cromossomo estão, de alguma maneira, reportados para casos familiares de DI. A natureza do evento mutacional também é ampla, sendo mutações de ponto em sequências codificantes e regulatórias, alterações de dosagem causadas por microduplicações e microdeleções e expansões dinâmicas causadas por instabilidade genômicas já registradas na literatura para essas doenças (GECZ, 2009; , PITON *et al.*, 2013; RAYMOND, 2006).

Entretanto, apesar do recente avanço na compreensão da genética das formas ligadas ao cromossomo X de DI (DILX), recentes trabalhos têm falhado em identificar a base genética subjacente em cerca de 60% dos casos de DILX em coortes (TARPEY *et al.*, 2010). Além disso, mais recentemente, tem se observado que a definição da relação de casualidade em mais de 20% dos genes associados a formas ligadas ao X de DI permanece nebulosa, devido à inexistência da replicação do achado em famílias clinicamente definidas (PITON *et al.*, 2013).

Dessa maneira, o presente estudo se propõe a contribuir com o avanço do entendimento da biologia da deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, através do estudo clínico e molecular de duas famílias oriundas do Estado de Pernambuco e arroladas ao Serviço de Genética Medica do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira.

2. OBJETIVOS

2.1: Objetivo geral:

Contribuir para a compreensão da base genética da Deficiência Intelectual Ligada ao Cromossomo X (DILX) através da análise molecular de duas famílias afetadas por essa condição genética.

2.2: Objetivos específicos:

- Caracterizar fenotipicamente as famílias afetadas;
- Coletar o DNA e analisá-lo, visando buscar pela alteração molecular responsável pra doença;
- Realizar o aconselhamento genético baseado na informação obtida pelos estudos genéticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A inteligência humana em seus estados normal e patológico

Embora seja um conceito fundamental da psicologia moderna, a definição de inteligência ainda gera muitos debates. Apesar disso, algumas tentativas de definir tal característica têm levado ao desenvolvimento de descrições que, embora não sejam unanimidade no meio acadêmico, têm sido amplamente aceitas. Paulo Dalgalarondo, em seu livro “*Psicopatologia de transtornos mentais*”, descreve a inteligência como sendo o conjunto de todas as capacidades cognitivas do indivíduo, a “resultante” de todos esses “processos intelectivos”, que proporcionam ao indivíduo a capacidade de interpretar o meio em que vive e dar respostas adaptativas a este. Dessa maneira, quanto maior for a capacidade de um indivíduo de integrar e associar diferentes conceitos, quanto mais rápido for a sua velocidade no oferecimento de respostas adaptativas que favoreçam a si próprio e quanto maior for o volume de informações que conseguir absorver, mais inteligente será (DALGALARRONDO, 2000).

Como qualquer outra característica multifatorial, os níveis de inteligência variam entre indivíduos em populações. Esta é uma observação antiga, e que gerou acalorados debates entre cientistas, durante o século XIX e primeira metade do século XX. No centro dessa polêmica estava a observação de que regiões extensivas do encéfalo, chamadas de córtices associativos, seriam responsáveis pela cognição. Tal conhecimento científico levou cientistas da época (entre eles o geneticista inglês Francis Galton, que era primo de Charles Darwin, e o eminente neurologista francês Paul Broca) a suporem que as diferenças volumétricas de crânios entre indivíduos, quando corrigidos para a razão crânio:volume corporal, poderiam estar relacionados com a diferença dos níveis de inteligência. Trabalhos detalhados, visando medir o volume craniano de diversas populações foram realizados por pesquisadores nessa época, e muitos achados desses profissionais foram usados como embasamento teórico para políticas racistas e misóginas. O próprio Broca advogava que o homem branco europeu possuía o crânio maior, e, por conseguinte, era mais inteligente que o negro ou o nativo americano (GOULD, 1981; PURVES, 2010)

A maneira simplista com que características tão complexas quanto as habilidades cognitivas foram lidas por Paul Broca e seus contemporâneos perdurou por muito tempo, até que evidências contrárias àquela hipótese, baseadas na acumulação de conhecimentos sobre funções cerebrais, foram obtidas. Atualmente, sabe-se que o uso do volume do encéfalo como uma característica

correlacionável à inteligência humana não se sustenta cientificamente. Isso porque tal atitude ignoraria a multiplicidade de funções desempenhadas por este órgão. Nesse sentido, alguns trabalhos recentes têm tentado correlacionar, de uma maneira mais lógica, a acuidade da visão com o tamanho do córtex visual primário ou a densidade sináptica com a arborização dos dendritos (PURVES, 2010).

Jean Piaget, em seus trabalhos pioneiros, defende que a aquisição de conhecimento é um processo construtivo, baseado na assimilação e integração contínuas de “*esquemas cognitivos*” novos e na substituição de esquemas cognitivos prévios. Nesse sentido, ele dividiu o processo de desenvolvimento das habilidades cognitivas humanas em quatro estágios distintos, a saber: período sensório-motor, pré-operatório, operatório concreto e operatório formal (DALGALLARONDO, 2000).

O período sensório-motor, que ocorre durante os primeiros dois anos de vida, caracteriza-se pela ausência do pensamento, da linguagem e a função simbólica. Dessa maneira, a atividade mental do indivíduo durante essa fase do desenvolvimento baseia-se em percepções reflexivas e atividades motoras. Esse período é caracterizado, também, pela presença da imitação como processo do desenvolvimento da cognição. É durante esse período que se começa a estabelecer a definição dos conceitos de “coisas”, “casualidade” e “tempo e espaço”. Já o período pré-operatório, que caracteriza o desenvolvimento intelectual infantil dos 2 aos 7 anos de vida, é marcado pela aquisição da linguagem e a capacidade da representação do meio. O desenvolvimento daquilo que Piaget chama de “*meia lógica*” (a capacidade de estabelecer uma lógica nas operações mentais, ainda que incompleta) também ocorre nesse período e a atividade de brincar torna-se um elemento fundamental no desenvolvimento cognitivo. Por sua vez, o período operatório concreto, que vai dos 7 aos 12 anos de idade, observa-se o surgimento do pensamento lógico e da capacidade do indivíduo agir de acordo com as suas ideias e pensamentos. Essa fase caracteriza-se, também, pelo pleno desenvolvimento das interações sociais e da capacidade de cooperação. Por fim, o período operatório-formal, que compreende dos 12 aos 16 anos, é marcado pelo aumento significativo do indivíduo interpretar ideais abstratas e fazer complexas correlações entre elas. É nessa fase que ocorre a plena capacidade da compreensão de sistemas lógicos e matemáticos (DALGALLARONDO, 2000).

Dentro desse panorama, alterações no desenvolvimento de capacidades cognitivas funcionais chamam atenção, tanto do ponto de vista médico/epidemiológico quanto do ponto de vista social, visando oferecer aos portadores de tais condições um direcionamento clínico, pedagógico e

integração à comunidade. Esse grupo heterogêneo de indivíduos portadores de tais defeitos no desenvolvimento cognitivo é dito possuidor de deficiência intelectual (DI). Esse termo, recente na nomenclatura médica, foi cunhado com o objetivo de afastar conotações negativas que termos anteriores como “retardo mental”, “mongolismo” e “idiotia” eram ditos possuir na sociedade (REGAN e WILLATT, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu mais recente Código Internacional de Doenças (CID-10) classifica DI como uma alteração do neurodesenvolvimento, que se caracteriza pela interrupção ou pelo desenvolvimento incompleto do funcionamento intelectual do indivíduo. Esse atraso desenvolvimental deve ocorrer antes dos 18 anos de idade e geralmente envolve danos em funções de linguagem, motricidade, comportamento social e habilidades acadêmicas funcionais (CID -10; RAYMOND, 2006).

Indivíduos portadores de deficiência intelectual geralmente possuem dificuldades adaptativas, intelectuais, de autocuidado, trabalho e de um modo geral, interagir de forma produtiva com a sociedade na qual está inserido. Um componente importante do diagnóstico de DI é a avaliação do quociente de inteligência (QI). Embora se convença que um indivíduo com QI abaixo de 70 possui um comprometimento intelectual significativo, deve-se evitar o diagnóstico de DI para indivíduos que, a despeito desse resultado, consigam interagir de maneira bem sucedida com a sociedade e possuam um alto rendimento intelectual. Nesse caso, o resultado do teste de QI seria considerado como “falso positivo” (DALGALLARRONDO, 2000; RAYMOND, 2006; REGAN e WILLATT, 2010).

Os testes de quociente de inteligência são a fonte primária para avaliação das habilidades cognitivas dos indivíduos com suspeita de DI. Estes consistem em um grupo definido de questões que objetivam avaliar diferentes habilidades verbais, capacidade de abstração e de raciocínio lógico. Através da avaliação de diferentes grupos populacionais por esses testes, observou-se que a média populacional do QI corresponde a 100. A maioria dos indivíduos em uma dada população (em torno de 68%) seriam alocados nessa categoria mediana, que vai de 85 a 100. Quocientes de inteligência entre 115 a 120 caracterizam portadores de “inteligência superior”, já pessoas com QI acima de 130, são ditos pessoas com inteligência “muito superior”. É importante ressaltar, entretanto, que os fatores culturais e sociais onde os indivíduos estão inseridos devem ser levados em consideração ao avaliar um teste de quociente de inteligência. Isso evitaria que padronizações excessivas acabem por deixar de levar em consideração possíveis discrepâncias entre resultados do teste e performances individuais (DALGALLARRONDO, 2000).

Os testes de QI são as ferramentas mais largamente utilizadas para avaliação da deficiência intelectual, a despeito de toda a crítica atribuída aos mesmos. Deve-se ao esforço do geneticista Francis Galton (1822 – 1911), a primeira tentativa de escalonar a inteligência em indivíduos. Foi a partir de tais trabalhos que se desenvolveram ferramentas até hoje usadas para análise de características multifatoriais, como o conceito de herdabilidade e a regressão linear. Quando avaliando características complexas, entre elas a inteligência, Galton identificou padrão de distribuição normal, cunhando a expressão “lei da suprema falta de ordem” para designar tal comportamento. O próprio Francis Galton desenvolveu uma teoria de herança dos caracteres entre organismos vivos que por vinte anos rivalizou as leis mendelianas. Conflito esse que foi resolvido pelo eminente biólogo inglês Ronald Fisher (HARTL e CLARK, 2010).

Apesar do pioneirismo, a avaliação do QI elaborado por Francis Galton mostrava-se também incompleto e foi fonte de muito criticismo devido aos seus propósitos eugenistas. Dentre os testes posteriormente desenvolvidos, alguns dos mais amplamente usados na atualidade são de autoria do psicólogo David Wechsler, a saber: WAIS –R (*Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised*) e WISC –R (*Wechsler Intelligence Scale for Children – Revised*) (DALGALLARONDO, 2000).

3.2 Deficiência intelectual: aspectos clínicos, etiológicos e classificação.

Os primeiros estudos sistemáticos de indivíduos com deficiência intelectual remontam à primeira metade do século passado, quando Lionel Penrose publicou o resultado de sete anos de estudo de pacientes com DI internados na região de Colchester, Reino Unido (Raymond 2006; Raymond & Tarpey, 2007). O seu trabalho pioneiro, publicado em 1936, teve como título “*The Colchester survey: an ethiological study of 1280 cases of mental defect*” e é caracterizado pela sua originalidade e pela riqueza de detalhes. Não só se restringiu Penrose a analisar os casos de deficiência intelectual arrolados na coorte, como também avaliou todas as respectivas famílias dos probandos, juntando dados clínicos sobre todos esses indivíduos, na tentativa de identificar a causa da deficiência mental em todas as famílias (Laxova, 1998). Como um desdobramento do seu trabalho inicial, o livro “*Biology of Mental Defect*” (sendo a última edição lançada em 1972) foi publicado por Penrose (LAXOVA, 1998; RAYMOND, 2006).

A DI é um dos transtornos neurológicos mais frequentes em crianças, o que faz essa condição tornar-se de grande importância do ponto de vista da saúde pública e do cuidado primário

na infância. Visando determinar a frequência da ocorrência desse fenótipo complexo em populações humanas, trabalhos anteriores se esforçaram por determinar a sua prevalência, obtendo resultados que variam entre 2,8 e 7,3 por 1000 indivíduos para formas graves de DI, e 3,2 e 79,3 por 1000 para as formas moderadas em países industrializados. A divergência entre os resultados obtidos pode ter sido proveniente, entre outros fatores, das diferentes metodologias aplicadas quanto a classificação dos casos, dos critérios para entrada na coorte e da indisponibilidade de dados referentes aos períodos prenatal e perinatal (STROMME, 2000 ; MOOG, 2005).

Na literatura observa-se também uma tendência para o declínio da prevalência de DI em populações humanas, principalmente no que se refere às formas moderadas de deficiência intelectual . Complexos fatores sociais e econômicos tais como a melhoria da qualidade de vida de comunidades urbanas em países industrializados, podem estar entre os agentes relacionados a esse aumento do QI nas gerações mais recentes. O declínio das formas severas, entre outros fatores, pode ser explicado pela maior disponibilidade de testes pré- natais para condições genéticas onde DI aparece como um dos principais fenótipos associados (STROMME, 2000).

Estudos sobre a etiologia de DI variam consideravelmente quanto ao sistema de classificação adotado. A variação da metodologia empregada possui implicações importantes no que se refere à possibilidade da comparação dos dados existentes na literatura. De um modo geral, MOOG (2005) classifica as triagens clínicas em três grandes grupos, a saber:

- Análises que classificam o tipo de DI como de origem genética, ambiental e desconhecida;
- Análises que classificam o momento do surgimento da DI, como de origem pré-natal, perinatal e pós-natal e desconhecida;
- Análises que juntam conceitos dos dois sistemas acima mencionados.

Como exemplo do primeiro sistema de classificação, destaca-se o trabalho de ANDERSON *et al.* (1997), que pela análise de 7600 pessoas com DI na Carolina do Sul, Estados Unidos, subdividiu as causas de origem genética em “monogênica”, “multifatorial”, “aberrações cromossômicas”, “síndromes reconhecíveis” e “cultural -familiar”. Essa autora se aproxima da segunda forma de classificação quando descreve as formas ambientais de DI, pois as classifica de acordo com o momento onde o determinado insulto ao organismo causou o atraso no desenvolvimento intelectual.

Nesse sentido, as formas ambientais são subdivididas em pré – natal, perinatal e pós – natal (MOOG, 2005).

Outro exemplo semelhante ao supracitado é descrito no trabalho de STROMMAE e HAGBERGER, (2000). Esses autores descrevem uma análise epidemiológica da incidência de deficiência intelectual em crianças nascidas entre 1980 e 1985, no condado de Akershus, Noruega. No total, o histórico clínico de 30 037 pacientes (15 495 meninos e 14 542 meninas) foi avaliado e, a partir dessa triagem inicial, 178 crianças com deficiência intelectual foram identificadas e extensivamente estudadas. Nesse trabalho, os autores separam a etiologia de DI em duas classes distintas, denominadas biopatológica e inespecífica. A classe “biopatológica” é subdividida de acordo com o momento em que a biopatologia pôde ser estabelecida, a saber: pré-natal (antes do nascimento), perinatal (do nascimento ao vigésimo oitavo dia de nascimento) e pós - natal (depois do vigésimo oitavo dia de nascimento).

Nesse sentido, MOOG, (2005), visando unificar a maneira como se classifica, propõe um método dinâmico de classificação para deficiência intelectual. Nesse teste os casos de DI seriam classificados de acordo com o grau de certeza do diagnóstico. Na categoria I seriam alocados os indivíduos cujo diagnóstico seria definitivo, já na categoria II, os casos provisionais, ou seja, aqueles que ainda possuem certo grau de incerteza quanto à natureza etiológica do fenótipo. De um modo geral, os indivíduos com deficiência mental são separados quanto às suas etiologias, nas seguintes categorias: genético, adquirido e desconhecido. Um melhor detalhamento desta classificação e a comparação com outros sistemas abordados por outros autores estão descritos na tabela 1.

Outra maneira de classificar casos de deficiência intelectual seria quanto à presença de outras alterações físicas e comportamentais. Quando observado isoladamente, a DI é dita ser não-sindrômica ou pura. Por outro lado, quando associada a alterações morfológicas e psiquiátricas, a deficiência mental é dita sindrômica. Vale apenas ressaltar que esta dicotomia é apenas uma classificação artificial, baseada no viés observacional e que, muitas vezes, não se sustenta a partir do ponto de vista molecular dessas enfermidades, uma vez que muitas alterações genéticas têm sido reportadas tanto para casos sindrômicos quanto para não sindrômicos (RAYMOND, 2006; RAYMOND e TARPEY, 2006; REGAN e WILLATT, 2010)

Tabela 1. Diferentes sistemas de classificação de casos de deficiência intelectual

STEVENSON <i>et al.</i> , (2003)	STROMMAE, (1997)	MOOG , (2005)
1. Genético	1 Biopatológico	1. Genético
1.1. Alterações cromossômicas	1.1 Pré-natal	1.1 Alterações cromossômicas
1.2 Alterações monogênicas	1.1.1 Genético	1.2 Alterações monogênicas
1.3. Multifatorial	1.1.1.1 Alterações cromossômicas	1.3 Síndromes desconhecidas, incluindo microduplicação/ microdeleção
1.4 Síndromes com base genética presumida	1.1.1.2 Síndromes específicas	1.4 Multifatorial
1.6 Cultural- familiar	1.1.1.3 D.I. associada à neurodegeneração defeitos do desenvolvimento	2. Desconhecido
1.7 Outros	1.1.1.4 D.I. familiar	2.1. Malformações desconhecidas do sistema nervoso central (SNC)
2 Ambiental	1.1.2 Adquirido	2.2 Malformações do SNC e alterações congênicas
2.1. Injúria pré-natal	1.1.3 Desconhecido	2.3. Malformações do SNC, alterações congênicas e/ou dismorfismo
2.2 injúrias perinatais	1.1.3.1 Síndromes inespecíficas, associadas a dismorfismo	2.4. Deficiência intelectual (DI) pura
2.3 Injúria pós-natal	1.1.3.2 Anomalias cerebrais	2.5. DI associada a microcefalia ou macrocefalia
2.4 Infecção pré-natal	1.2. Perinatal	2.6. DI associada a alterações neurológicas
2.5 Infecção perinatal	1.3. Pós - natal	2.7. DI associada a alterações psiquiátricas e comportamentais
2.6 Infecção pós- natal	1.4. Não determinado	2.8 Não classificado
2.7 Exposição a agentes químicos pré-natal	1.4.1. Predominantemente psiquiátrico	3. Adquirido
2.8 Exposição a agentes químicos perinatal	1.4.2. Predominantemente neurológico	3.1. Pré-natal
2.9 Exposição a agentes químicos pós-natal	2. Deficiência intelectual inespecífica	3.2 Perinatal
2.10 Prematuridade		3.3 Pós-natal
2.11. Desconhecido		

Em seu trabalho de revisão, RAYMOND, (2006), classifica portadores desse fenótipo em quatro categorias distintas: DI leve (QI 50 – 70), DI moderada (35 – 49), DI severa (20 - 34) e DI profunda (<20). Dalgallarrondo (2000), além de tais grupos, cita a presença de uma “inteligência limítrofe, com QI entre 70 - 85. Muitos indivíduos categorizados nessa classe podem ser sujeitos atuantes na sociedade, e só apresentarem dificuldades no âmbito acadêmico, durante o ensino médio ou terceiro grau. Vale a pena ressaltar que a categoria previamente citada não constitui DI, mas é citada com o objetivo de ilustrar a presença do nível de QI baixo que ocorre em indivíduos normais , correspondendo ao que se esperaria de uma característica poligênica (Dados resumidos na tabela 2).

A deficiência intelectual leve compreende o maior grupo (cerca de 85%) dos indivíduos afetados por DI. Os pacientes incluídos nessa categoria são independentes quanto as suas capacidades de autocuidado: são capazes de se vestir, tomar banho e cuidar-se sozinhos. Controle sfinteriano também é presente. São capazes de realizar trabalhos que não exijam muita atividade intelectual, pois possuem problemas com a compreensão de ideias mais abstratas e raciocínios complexos. Podem demonstrar dificuldades na leitura e escrita (DALGALLARONDO, 2000).

Os indivíduos com deficiência intelectual moderada, por sua vez, apresentam um comprometimento cognitivo considerável, apresentando dificuldades na escola para o aprendizado da leitura, escrita e de operações matemáticas. Muitos desses indivíduos não chegam a terminar o ensino básico e, geralmente, são apenas capazes de manter conversas superficiais. A presença de epilepsia é recorrente nesses pacientes. Cerca de 10% dos indivíduos diagnosticados com DI são categorizados nesse grupo (DALGALLARONDO, 2000).

Representando em torno de 3 a 4% dos pacientes com DI, o grupo que corresponde aos afetados com deficiência intelectual grave caracteriza-se por possuírem a incapacidade de se comunicar, tendo, frequentemente, aprendido apenas algumas palavras. Esses indivíduos necessitam de cuidados constantes na maioria das suas atividades de higiene e apresentam crises epiléticas e outros distúrbios neurológicos com frequência (DALGALLARONDO, 2000).

A deficiência intelectual profunda corresponde a cerca de 1 a 2% dos pacientes com DI. Esses indivíduos necessitam de acompanhamento constante, pois são confinados ao leito e são incapazes de se comunicar ou reagir adequadamente instruções simples. Não possuem controle sfinteriano (DALGALLARONDO, 2000)

Tabela 2. Tipos de deficiência intelectual classificados de acordo com a Severidade do transtorno.

Tipo de deficiência intelectual	Proporção relativa dos afetados	Idade mental aproximada	Valor no exame do QI
Leve	85%	9 a 12 anos	50 a 70
Moderada	10%	6 a 9 anos	35 a 49
Grave	3 a 4%	3 a 6 anos	20 a 34
Profunda	1 a 2%	-	<20

(Adaptado de DALGALARRONDO, 2000).

3.3 Arquitetura genética da deficiência intelectual

A descrição de sinais clínicos que, muito frequentemente, apresentam-se em conjunto, num padrão consistente e reconhecível e com uma causa única e definida, levou à descrição de diferentes síndromes específicas. A princípio, essa caracterização se deu sem a compreensão da base molecular subjacente a tais alterações, mesmo que autores como o próprio Waardenburg 1932 já hipotetizassem que estas eram uma consequência de alterações cromossômicas (MATTEVI e MIRANDA , 2011).

Inicialmente, apenas as formas e o número cromossômico puderam ser avaliados. Entretanto, com o crescente desenvolvimento das técnicas de identificação e caracterização dos cromossomos humanos e suas alterações estruturais e numéricas, a base genética desses distúrbios começou a ser compreendida. Historicamente, nesse processo destacou-se o método do choque hipotônico de Tjio & Levan em 1956, o desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico, a hibridização

in situ por fluorescência (FISH), e a hibridização genômica comparativa (array CGH) nas décadas de 70, 80 e 90, respectivamente (NUSSBAUN *et al.*, 2010; MATTEVI E MIRANDA, 2011). Paralelo a esse desenvolvimento na citogenética, o delineamento dos primeiros mapas físicos do genoma humano e de técnicas moleculares como a clonagem posicional, possibilitaram a identificação de mutações de ponto em genes que também pudessem explicar tais fenótipos. Mais recentemente, com o advento da genômica, o sequenciamento de genomas inteiros ou de conjuntos de exons dos genes de um determinado indivíduo, tem acelerado enormemente a identificação da base molecular de tais condições genéticas. (SCHUURS-HOEIJMAKERS *et al.*, 2013)

O conhecimento da etiologia genética, não só da deficiência intelectual, mas também de todas as outras classes de condições genéticas, possui um impacto direto no aconselhamento genético de famílias afetadas por essas alterações, permitindo uma orientação clínica mais precisa. Além disso, esse conhecimento permite que se possa compreender mecanismos moleculares fundamentais que, quando alterados, ocasionam tais alterações genéticas, abrindo oportunidades para intervenções terapêuticas (NG *et al.*, 2010).

As formas de deficiência intelectual cuja etiologia é genética têm uma base molecular extremamente diversa. Dessa maneira, a literatura registra diferentes classes de alterações no genoma relacionados a DI, a saber: aneuploidias cromossômicas e alterações cromossômicas estruturais, tais como microduplicações e microdeleções intersticiais e subteloméricas (também chamadas de CNVs) e mutações de ponto (RAYMOND e TARPEY, 2006).

3.3.1 Alterações cromossômicas numéricas

Uma base genética para a deficiência intelectual é conhecida desde a descoberta feita por Lejeune, em 1959, de que indivíduos com a Síndrome de Down possuíam um cromossomo 21 extra (MEFFORD *et al.*, 2012). Em sua grande maioria, as aneuploidias estão entre as maiores responsáveis pelos abortamentos espontâneos, uma vez que tal alteração do conteúdo gênico inevitavelmente leva a alterações no desenvolvimento que são incompatíveis com a vida. Entretanto, há na literatura registros de tais alterações cromossômicas associadas a graves quadros clínicos que também estão associados a deficiência mental, a saber, trissomia do cromossomo 21

(síndrome de Down), trissomia do 18 (síndrome de Edwards), trissomia do 13 (síndrome de Patau) e trissomias dos cromossomos 8 e 9 (FRAGA *et al.*, 2011).

A Síndrome de Down (SD) (OMIM 190865) é a forma genética mais comum de deficiência intelectual e de alteração cromossômica, possuindo uma prevalência de 1:730 entre nascidos vivos. Há também, na literatura, a observação de que o risco de ter um filho com a SD aumenta de acordo com o avanço da idade materna, sendo em torno de 1 para 1000 o risco de uma mulher de 30 anos ter um filho com essa alteração e 9 para 1000, quando considerando mulheres acima dos 40 anos. Esse fato provavelmente advém do progressivo aumento de chance de erros durante a finalização do processo meiótico em células germinativas femininas, que estão constitutivamente na prófase I, e, em menor grau, de erros no processo meiótico em células germinativas masculinas. Outros trabalhos têm apontado que a localização cromossômica dos eventos de recombinação podem influenciar o processo de segregação das cromátides e, por conseguinte, ocasionar alterações cromossômicas (HASSOLD e HUNT, 2001; HASSOLD *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2011).

Indivíduos com SD caracterizam-se por apresentarem várias malformações e dismorfias, entre elas: braquicefalia, macroglossia, pregas epicânticas, pescoço curto, prega palmar única, hiperflexibilidade das articulações e malformações cardíacas. Além disso, um comprometimento intelectual de leve a moderado é característico para essa condição, sendo notado logo no primeiro ano de vida, através de atrasos na idade média ao sentar (normal: 6 a 7 meses ; SD: 11 meses) e ao caminhar (normal: 12 meses; SD: 26 meses). Entre as alterações cardíacas observadas, destacam-se o defeito no septo atrio-ventricular e o defeito no septo ventricular. Alguns pacientes também apresentam defeitos no trato gastrointestinal, tais como estenose duodenal, pâncreas anular e ânus imperfurado (FRAGA *et al.*, 2011).

Citogeneticamente, a etiologia da SD é bastante conhecida e registrada na literatura, com 94% dos casos originados a partir de uma trissomia do cromossomo 21 que está presente em todas as células do indivíduo (47, XX ou XY,+21). Menos frequentemente, uma translocação Robertsoniana, envolvendo os cromossomos 21, 13 e 14 (todos acrocêntricos) corresponde de 3 a 4% dos casos de SD. Esse caso é oriundo de um genitor que, a despeito do fato de ser portador da translocação, (cariótipo 45,XX ou XY, rob(14;21)(q10;q10) por exemplo), tem o conteúdo do genoma balanceado. Esse caso não ocorrerá em sua prole, que terá uma chance em três de levar um cromossomo derivativo da fusão cêntrica entre o 21 e o 13, 14 ou 22, e, portanto, ter a “dosagem” de genes do cromossomo 21 excedente. Por fim, de 2 a 3% dos casos correspondem a um

mosaicismo de trissomia do cromossomo 21. Nesse caso, duas populações de células, com diferentes cariótipos, são encontradas no indivíduo (47, +21/ 46) (FRAGA *et al.*, 2011).

Entretanto, é importante ressaltar que, a despeito do fato de sua base citogenética ser claramente compreendida, só se poderá ter uma compreensão plena da correlação fenótipo/genótipo da síndrome de Down quando os genes localizados no cromossomo 21 relacionados às alterações fenotípicas dessa enfermidade forem localizados. Trata-se de uma tarefa complexa, uma vez que nem todos os genes desse cromossomo são sensíveis a alterações do nível de dosagem gênica, e muitos transcritos que previamente eram descritos como unidades separadas só agora tão sendo observados como partes constituintes de um mesmo gene (BIRNEY *et al.*, 2007; WISEMAN *et al.*, 2009). Apesar disso, um número de genes tem sido associado a SD devido aos seus papéis moleculares associados a processos de desenvolvimento e a atividades sinápticas que, quando alteradas, podem ocasionar deficiência intelectual. Entre esses genes, pode-se exemplificar DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1 A), sinaptojanina 1, SIM2 (single-minded homolog 2), entre outros (WISEMAN *et al.*, 2009).

A síndrome de Edwards (trissomia do cromossomo 18) é a segunda forma de trissomia mais comum (em torno de 1 para 5500 nascidos vivos) e, semelhantemente à síndrome de Down, tende a ter uma correlação com o aumento da idade materna. A não-disjunção meiótica está relacionada a 90% dos casos dessa síndrome. Entre as manifestações clínicas mais recorrentes nessa patologia, encontram-se a hipertonia, micrognatia, osso occipital proeminente e segundo e quinto dedos da mão sobrepostos aos demais. Malformações cardíacas estão presentes em 50% dos casos e alterações no processo de rotação do sistema gastrointestinal também são registrados para síndrome de Edwards. Em torno de 50% das crianças afetadas com essa alteração falecem na primeira semana de vida, e apenas 5 a 10% sobrevivem no primeiro ano de vida. Um grave comprometimento intelectual é registrado para os indivíduos com essa síndrome (WU *et al.*, 2013; FRAGA *et al.*, 2011).

Por sua vez, a síndrome de Patau (SP) é caracterizada pela trissomia do cromossomo 13. Entre os fenômenos citogenéticos que caracterizam o complemento cromossômico dos indivíduos afetados por essa patologia, encontram-se a presença do cromossomo 13 extra em todas as células (47,XX ou XY,+13), o mosaicismo para o cariótipo supracitado (47+13/46) e uma translocação Robertsoniana envolvendo o braço longo do cromossomo 13. Em uma recente análise de 30 pacientes com essa alteração citogenética Petry e colaboradores (2013) observaram que, tipicamente, indivíduos com SP apresentam-se com: criptorquidismo (78%), defeitos cardíacos congênitos (76%), polidactilia (63%) e polidactilia (60%). Esses autores também observaram que

13% desse grupo de pacientes apresentavam, simultaneamente, fendas palatinas, polidactilia e micro/ anoftalmia.

Há também, na literatura, a descrição de mais de 100 casos de indivíduos com trissomia do cromossomo 8. Nesse caso, os indivíduos são invariavelmente mosaicos (47,+8/46) pois a trissomia total do cromossomo 8 é incompatível com a vida. A severidade das alterações do desenvolvimento que estão associadas a essa aneuploidia cromossômica parece estar associada à razão entre a população de células trissômicas e células normais. Clinicamente, esses indivíduos são caracterizados por apresentarem um comprometimento cognitivo de leve a grave, lábios grossos, clinodactilia, camptodactilia e outras anomalias ósseas (FRAGA *et al.*, 2011).

3.3.2 Alterações cromossômicas estruturais

Casos de aneuploidias também têm sido associados a quadros sindrômicos específicos, muitos deles com o diagnóstico definido antes mesmo da realização do teste citogenético por bandejamento G ou array CGH. Comparativamente, indivíduos afetados por essa classe de alterações tende a ter uma sobrevida maior à dos afetados por alterações envolvendo cromossomos inteiros, dado o número inferior de genes cujos processos regulatórios estão alterados (REGAN e WILLATT, 2010).

A Síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH) (OMIM 194190) foi inicialmente descrita por Hirschhorn e Wolf em dois relatos de casos, publicados independentemente por cada um desses autores, em 1961 e 1965, respectivamente. Nesses trabalhos, observou-se uma deleção num cromossomo do grupo B (compreende os pares 4 e 5 do complemento humano) associado a um quadro sindrômico comum, que depois tornou-se associado aos nomes dos autores e definido como uma deleção na porção distal do braço curto do cromossomo 4 (del(4)(p16.3)) (FISCH *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos mostram que esta condição possui uma incidência de 1/ 50 000 a 1/ 20 000 nascimentos, ocorrendo uma tendência para um maior número de indivíduos do sexo feminino, numa razão de aproximadamente 2:1 em relação aos do sexo masculino.

O estudo de 87 pacientes diagnosticados com SWH originários dos Estados Unidos e Itália demonstrou que todos os indivíduos apresentaram o que é, reconhecidamente, a característica mais marcante dessa síndrome: uma associação de dismorfismos que é chamado conjuntamente de “capacete grego” (testa alta, glabella proeminente, hipertelorismo, sobrancelhas arqueadas, olhos protusos, dobras epicânticas, filtro nasal curto e micrognatia). Outras características marcantes observadas nesse grupo de pacientes foram: microcefalia (90% dos indivíduos), fissuras labiais (30%) e ptose da pálpebra (50%). Convulsões ocorreram em 93% dos pacientes, com a idade de início entre os três primeiros anos de vida. Estudos de neuroimagem foram realizados em 57 dos pacientes desse estudo, 80% desses apresentando alterações estruturais, tais como hipoplasia do corpo caloso (55%), aumento dos ventrículos laterais (33%) e atrofia cortical e/ou subcortical (29%). Deficiência intelectual grave foi registrada para 65% dos pacientes, sendo 25% observados com um grau moderado e 10% leve de DI (BATTAGLIA *et al.*, 2008).

A síndrome de Wolf-Hirschhorn tem uma base citogenética bem definida, causada pela perda parcial da banda 4p16.3. Dentro dessa região, duas zonas críticas (WHSCR1 e WHSCR2) para essa condição compreendem um segmento de 300 a 600 kilobases e compreendem os genes WHSC1 e LETM1, sendo atribuído ao primeiro as dismorfias faciais características de SWH e ao segundo (uma proteína envolvida em Ca⁺ sinalização), as convulsões que são recorrentes nessa síndrome. Nenhuma mutação de ponto ou deleção de um único gene tem sido descrita para essa alteração genética. Entretanto, a haploinsuficiência dos genes contidos naquela banda cromossômica é o mecanismo subjacente mais provável à essa alteração, o que faz SWH ser classificada como uma síndrome de genes contíguos (REGAN e WILLATT, 2010).

A análise cromossômica de uma série de 87 casos dessa síndrome mostrou que o ponto de quebra variou entre 4p15.32 e 4p16.3, o que invariavelmente excluía WHSCR1 e WHSCR2 nesses pacientes. Estudos cromossômicos por bandeamento G foram suficientes para realizar o diagnóstico em 50,5%, enquanto FISH foi usada em 49,5% dos casos. A hibridização genômica comparativa (array CGH) foi executada em 34 pacientes e destes, 44% apresentaram uma translocação não balanceada, levando a monossomia de 4p e a trissomia de outro braço cromossômico. 65 pacientes aparentaram ter uma deleção pura, *de novo* dessa região cromossômica e um indivíduo mostrou-se portador de uma duplicação em tandem de 4p16.1 p16.3 associada a uma deleção de 4p16.3 pter. (BATTAGLIA *et al.*, 2008)

A síndrome Cri du Chat ou síndrome de deleção de 5p (OMIM 123450) foi inicialmente descrita por Lejeune em 1963 e também umas das alterações cromossômicas estruturais mais

comuns em humanos. Esta possui uma taxa de incidência entre 1:37000 e 1: 50000 entre recém-nascidos, com uma razão de 4:3 em relação à proporção relativa de indivíduos do sexo feminino e masculino afetados, respectivamente (SHETH *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2013).

Entre os principais achados nessa síndrome, encontram-se a hipoplasia da laringe, que ocasiona o choro específico dos recém-nascidos com Cri Du Chat (o próprio nome advém da semelhança do choro com o “miado de um gato”), microcefalia, rosto arredondado, hipertelorismo, micrognatia, dobras epicânticas, hipotonia, ponte nasal proeminente, problemas psicomotores severos e deficiência intelectual (GU *et al.*, 2013). O fenótipo em adultos difere consideravelmente do apresentado em crianças, e inclui o embranquecimento prematuro do cabelo e um atraso na fala e desenvolvimento da linguagem. Muitos indivíduos afetados por Cri Du Chat nunca chegam a desenvolver a fala, mesmo que de forma primitiva (REGAN e WILLAT, 2010).

Embora seja uma entidade clinicamente bem definida, a Síndrome Cri Du Chat apresenta importante variação fenotípica entre os indivíduos afetados e uma grande variação de alterações citogenéticas envolvidas. Aproximadamente 80% dos pacientes apresentam uma deleção *de novo* do braço curto do cromossomo 5 (5p), cerca de 10 a 15% dos casos resultam de uma segregação não-balanceada de rearranjos balanceados na linhagem celular parental, tais como translocações ou inversões. Uma minoria dos indivíduos com Cri Du Chat (menos de 5%) apresentam translocações *de novo*, alterações citogenéticas crípticas e outros rearranjos cromossômicos complexos (tais como cromotripse). Nestes últimos, processos de instabilidade genômica levam a formação de múltiplos e concomitantes pontos de quebra, seguidos de rearranjos cromossômicos realizados pela maquinaria de reparo de DNA, através de fusão de pontas não homólogas e junção de pontas mediada por micro-homologia(NHEJ – non homologous end joining e MMEJ – microhomology - mediated end joining, em inglês) (WATSON *et al.*, 2006; GU *et al.*, 2013,).

Uma análise de 34 pacientes dinamarqueses mostrou que, aparentemente, a região crítica para essa alteração cromossômica reside em 5p15.2 – 5p15.3, uma vez que as características clássicas associadas a essa condição só surgiam quando essa região estava deletada. Estudos citogenéticos e moleculares levaram a identificação de duas regiões distintas, uma associada ao choro “miado de gato”, em 5p15.3, entre os marcadores D5S13 e D5S760. A outra região, associada à microcefalia, deficiência intelectual e dismorfismos presentes em Cri Du Chat, localiza-se em 5p15.3, entre os marcadores D5S23 e D5S791. O genes genes da δ - catenina (CTNND2) e da semaforina (SEMAF), foram clonados para essas áreas, respectivamente, e estão associados a processos migratórios de progenitores neurais durante o desenvolvimento do córtex cerebral (MAINARDI *et al.*, 2001).

A Síndrome da deleção do cromossomo 18p (OMIM 146390) também é uma entidade clínica bem definida, inicialmente descrita em 1963 por Grouchy e colaboradores. Indivíduos com essa síndrome usualmente apresentam baixa estatura, face arredondada, filtro curto, ptose palpebral, deficiência intelectual e orelhas grandes. Em torno de 10 a 15% dos casos apresentam graves alterações neurológicas, como holoprosencefalia, além de malformações faciais. Nesses casos, a expectativa de vida é bastante comprometida (UCHIDA *et al.*, 1965; ARTMAN *et al.*, 1992). DE RAVEL *et al* (2005) argumenta, entretanto, que em casos ausentes daquelas malformações neurológicas, a expectativa de vida parece não ser reduzida.

A avaliação das alterações cromossômicas presentes em indivíduos com essa síndrome tem ajudado a melhor estabelecer a base molecular desse defeito do desenvolvimento, e entender quais genes são sensíveis a alteração da dosagem nesse loco. Tais estudos cromossômicos têm mostrado que a deleção na região entre 18p11.21 e p11.1 é crítica para a presença da deficiência intelectual nesses indivíduos e deleções envolvendo p11.3 têm sido associadas a graves malformações neurológicas (WESTER *et al.*, 2006). Em sua maioria, as alterações associadas a essa síndrome são *de novo*. Entretanto, há na literatura descrições da transmissão de rearranjos balanceados na linhagem parental que se tornam não balanceados na descendência, em sua maioria causada por translocações e inversões (WILLAT *et al.*, 2010).

Semelhantemente às anteriores, a Síndrome da deleção do cromossomo 18q caracteriza-se por ser também uma aneuploidia segmentar, com alterações provenientes de erros de dosagem em vários genes contíguos encontrados no loco correspondente à condição. Nessa desordem, os indivíduos são tipicamente descritos com deficiência intelectual, microcefalia, mielinização incompleta, malformações genito-urinárias e neurológicas, anormalidades auditivas e atraso no crescimento. Déficits nos níveis séricos de imunoglobulina A são comumente descritos, assim como malformações cardíacas e esqueléticas, sendo provavelmente a variabilidade clínica recorrente nessa desordem (assim como em outras de natureza similar) podem ser devido a, entre outros fatores, alterações de imprinting e tamanho da alteração cromossômica (BRKANAC *et al.*, 1998).

Uma análise cromossômica feita por BRKANAC *et al.*, (1998) em pacientes com essa alteração, revelou que o ponto de quebra, embora seja consideravelmente variável entre os indivíduos encontra-se entre 18q12.2 e q23. Trabalhos posteriores correlacionaram fenótipos relacionados a essa síndrome com locos específicos dentro da região acima mencionada. Dessa maneira, microcefalia estaria associada a 18q21.33, baixa mielinização a 18q22.3 – q23. Deficiência intelectual grave, por sua vez, estaria relacionada a 18q21.33, DI severa a 18q21.31 e

atresia congênita aural a 18q22.3. Estudos posteriores demonstraram que o ponto de quebra em um paciente com essa síndrome localizava-se entre os genes de serpinas (SCCA1 e SCCA2). Os produtos proteicos dos genes mencionados acima são inibidores de serinoproteases e estão relacionadas a processos de remodelamento da matriz extracelular e formação de conexões neurais, o que os tornam candidatos a estarem relacionados à severa deficiência intelectual descrita para esta condição (Katz e tal, 1999).

Mais recentemente, FEENSTRA *et al.*, (2011), através da análise de famílias com essa síndrome, identificaram uma região mínima comum de 459 kb, localizada dentro do gene TSHZ1, que em modelos murinos, desempenha papel preponderante para o desenvolvimento do ouvido médio. O sequenciamento posterior de casos de atresia aural congênita identificou mutações de ponto dentro desse mesmo gene, atribuindo dessa maneira o fenótipo em questão na síndrome 18q e em casos isolados à haploinsuficiência de TSHZ1.

3.3.3 Síndromes de Microdeleção e Microduplicação

Síndromes de microdeleção e microduplicação compreendem uma classe de condições genéticas que são clinicamente bem definidas e caracterizadas pela alteração da dosagem gênica em um segmento cromossômico curto. Tal alteração genômica apresenta, em geral, menos de 5 megabases (Mb) de comprimento, o que impossibilita a sua identificação através de técnicas rotineiras de laboratórios de citogenética, como o bandeamento G, que possui uma capacidade de observar rearranjos estruturais em torno de 10 Mb ou maiores. Por isso, o estudo dessas “doenças genômicas” demanda técnicas mais sensíveis, capazes de identificar esses fragmentos cromossômicos alterados. Dentre essas tecnologias, destacam-se a hibridização genômica comparativa (array CGH) e a hibridização in situ por fluorescência (FISH). Convencionalmente, atribui-se a essa alteração críptica de fragmentos genômicos o nome de “variações de número de cópias” (CNVs ou *copy number variations*) (RIEGEL, 2011).

Do ponto de vista evolutivo, alteração do número de cópias de segmentos do genoma desempenhou importante papel durante a história evolutiva dos diversos grupos taxonômicos dentro dos metazoários. Variações de números de cópias do genoma podem alterar o padrão de expressão do gene envolvido na alteração ou mesmo gerar material gênico que, por efeito de acumulação de mutações ao longo das gerações, resulta no surgimento de novos genes. Artigos recentes têm demonstrado que tal fenômeno é o principal mecanismo de surgimento de genes entre os animais, e que, particularmente na história evolutiva do *Homo sapiens*, variações de número de cópias foram selecionadas durante o processo de especiação a partir do ancestral comum aos outros macacos do Velho Mundo (WATSON *et al.*, 2006; JUAN *et al.*, 2013; SUDMANT *et al.*, 2013).

Molecularmente, CNVs podem surgir a partir de erros durante processos de recombinação, reparo e replicação de DNA. Basicamente, dois mecanismos despontam como os principais responsáveis pelo surgimento de tais variações no genoma, a saber: recombinação homóloga não alélica (NAHR *non-allelic homologous recombination*) e Junção de Pontas Mediada por Micro-Homologia (Microhomology-mediated end joining – MMEJ) (HASTINGS *et al.*, 2009).

A partir de um ponto de vista fisiológico, a recombinação homóloga ocorre especialmente em regiões intercaladas, com um espaçamento médio de 50 a 100 kb, chamadas de *hot spots* de recombinação. Para que esta ocorra é necessária a formação de quebras de fita dupla (DSB - *double strand breaks*). Tais quebras no genoma ocorrem por atividade da enzima Spo11, em eucariotos. Uma vez cindida, a fita de DNA é usada pela maquinaria celular para a realização do *crossing-over* e conseqüente troca de alelos entre cromossomos homólogos. Outro ponto importante nesse evento é a formação das junções de Holliday, que são estruturas de DNA formadas por ocasião do cruzamento das fitas que unem as duas moléculas recombinantes. Quando não está associado à troca de material genético entre cromátides homólogos, a recombinação homóloga também é um mecanismo pelo qual o genoma realiza o reparo de segmentos lesionados. Nesse caso, o reparo por recombinação promove um evento denominado conversão gênica, onde o fragmento lesionado é pareado à fita molde da recombinação e os eventuais malpareamentos são resolvidos de maneira a tornar os alelos iguais (WATSON *et al.*, 2006; MCVEAN, 2010)

A recombinação homóloga não alélica (NAHR) ocorre quando a maquinaria de recombinação realiza o *crossing over* em segmentos parálogos de DNA repetitivo. Tal evento acaba por traduzir-se em duplicações ou deleções de segmentos gênicos, causando assim, eventuais erros de dosagem. Conceitualmente chamadas de LCRs (*low copy repeats*) essas sequências caracterizam-se por terem em torno de 300 pb (pares de bases) ou mais, serem posicionadas em

tandem e possuem cerca de 80 – 95% de similaridade entre si. Outras sequências de considerável importância na NAHR são os elementos transponíveis, tais como os SINEs, LINEs e elementos Alu, que por serem altamente repetitivas no genoma humano, acabam por mediar essas alterações estruturais (FELIX *et al.*, 2010; MCVEAN, 2010). É importante ressaltar, entretanto, de que a célula dispõe de artifícios para impedir tais erros de recombinação. Trabalhos recentes mostram que coesinas, proteínas anulares que ligam cromátides irmãs, têm papel importante na regulação do reparo DSB e de eventos de recombinação, impedindo trocas não alélicas. Enzimas relacionadas a processos de reparo por malpareamento (entre elas MutS, MutL em *E. coli*) também desempenham importante papel no impedimento da ocorrência de NAHR (WATSON *et al.*, 2006; HASTINGS *et al.*, 2009; MCVEAN, 2010).

Em contraste à recombinação homóloga, há mecanismos de reparo e recombinação que usam pouca ou nenhuma homologia e que, eventualmente, ocasionam CNVs devido ao mal funcionamento desses processos moleculares. Esses eventos mediados por microhomologia são de vários tipos e podem ser agrupados em duas categorias que se distinguem a partir do mecanismo molecular envolvido, que pode ser replicativo ou não replicativo (HASTINGS *et al.*, 2009) (Figura 1).

Entre os mecanismos não replicativos, há duas vias de reparo DSB que não exigem homologia ou exigem homologia muito curta entre as sequências de DNA envolvidas: a junção de pontas não homólogas (NHEJ – *non homologous end joining*) e junção de pontas mediada por microhomologia (MMEJ – *microhomology –mediated end joining*). NHEJ junta pontas soltas de DSBs, durante esse processo pode ocorrer a fusão íntegra dos segmentos ou ocorrer a deleção de 1 a 4 pb, ocasionando microdeleções. Por outro lado, a inserção de sequências de elementos transponíveis dentro desse processo de reparo também é recorrente. Por sua vez, MMEJ utiliza-se de sequências com homologia entre 5 a 25 pb para realizar o anelamento de DSBs. Durante esse processo, microdeleções podem ser geradas a partir de um processo de “correção” que remove as pontas soltas e os malpareamentos (HASTINGS *et al.*, 2009).

Entre os mecanismos replicativos, o deslizamento da polimerase (*replication slippage*) e o FoSTeS (*fork stalling and mismatch switching*) podem ser exemplificados dentro dessa categoria. O deslizamento da polimerase ocorre devido a formação de grampos intrafilamentares durante a replicação do DNA. Durante esse processo, a polimerase acaba por amplificar ou diminuir a região repetitiva, ocasionando as chamadas “mutações dinâmicas” que têm um número variável de ampliações. Em condições de “stress celular”, a replicação do DNA pode ser interrompida. Em

ocasiões como esta, a ponta 3' da fita em síntese pode se deslocar e anelar em fitas moldes de forquilhas de replicação próximas, causando microdeleções entre as fitas envolvidas (HASTINGS *et al*, 2009; LUO *et al.*, 2011).

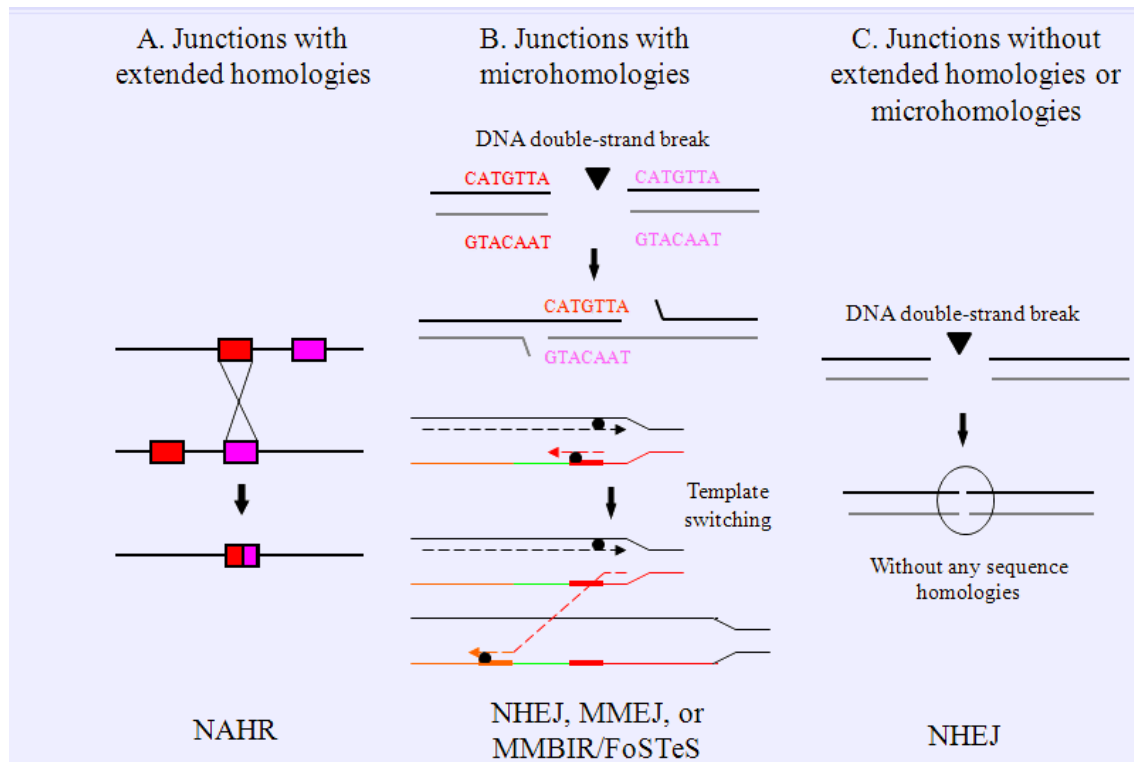


Figura 1: Os diagramas acima demonstram os principais eventos de recombinação que ocasionam variações de números de cópias no genoma humano (Ilustração retirada de <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/ChromFragSitesID20098.html> no dia 13.02.14).

Uma das síndromes de microdeleção mais bem caracterizadas, tanto do ponto de vista clínico quanto molecular, a síndrome de Smith-Magenis (SSM) (OMIM 182290) possui uma incidência de 1 a cada 25000 nascidos vivos. A maioria dos indivíduos com essa condição possuem uma deleção em 17p11.2, o que leva à haploinsuficiência do gene *RAI1* (*retinoic acid induced 1*), uma menor parcela, entretanto (em torno de 10%), apresentam mutações de ponto nesse mesmo gene (Maluf, 2011). Em uma análise de 30 pacientes com SSM, ANDRIEUX *et al* (2007) identificaram 3 portadores de deleções maiores (5, 8 e 12 Mb) dentro do loco associado a Smith-Magenis, dois dos quais apresentando fendas palatinas. Análises de dados de microarranjos de expressão mostraram que o gene *UBB* (ubiquitin B precursor) seria um candidato para a presença desse fenótipo naqueles indivíduos, visto que este é expresso no primeiro arco braquial entre a quarta e quinta semanas do desenvolvimento humano.

Do ponto de vista fenotípico, pacientes com SSM comumente apresentam braquicefalia, ponte nasal alargada e baixa estatura. Outros sinais clínicos recorrentes são limitação do movimento do cotovelo, com a sinostose radio – ulnar documentada para alguns pacientes, testa proeminente, prognatismo, baixa implantação da orelha e outras alterações (GREENBERG *et al.*, 1991).

A síndrome de microdeleção 3q29 (OMIM 609425) foi descrita por WILLAT *et al.*, (2005), a partir da análise de seis pacientes com esse rearranjo genômico. Estudos usando sondas de FISH, array CGH e marcadores microssatélite determinaram a região deletada como possuindo 1,5 Mb. Dentro desse fragmento, estão descritos 22 transcritos, dentre os quais 5 são genes conhecidos (PYT1A , PAK2, MFI2 , DLG1, BDH), 7 possuem apenas um ou dois fragmentos de cDNA documentados e 10 são apenas genes hipotéticos. A análise dos pontos de quebra da microdeleção mostrou, nesse trabalho, a presença de LCRs (*Low Copy Repeats*, ou Repetições de Baixo Número de Cópias, em português, usado para designar sequências de DNA repetidas com poucas cópias) com cerca de 98% de homologia a cada lado do rearranjo cromossômico, levando os autores a acreditarem que o provável mecanismo responsável pelo surgimento da alteração foi a recombinação homóloga não alélica (NAHR).

Dentre os genes candidatos, dois despontam como sendo promissores para definição da base molecular dessa alteração cromossômica: PAK2 e DLG1. Esses são homólogos de genes associados a formas ligadas ao cromossomo X de deficiência intelectual (PAK3 e DLG3) e também podem estar associados a processos moleculares em células neuronais (WILLAT *et al.*, 2005). Além dos genes supracitados, o gene FBOX45 também tem sido apontado como um gene candidato para essa síndrome (QUINTERO-RIVERA, *et al.*, 2010).

A análise clínica dos indivíduos com microdeleção de 3q29 demonstrou que esses indivíduos normalmente apresentam deficiência intelectual de leve a moderada e uma série de dismorfismos, malformações e alterações do neurodesenvolvimento, tais como palato fendido, microcefalia, rins em ferradura, comportamentos autistas e filtro nasal curto (WILLATT *et al.*, 2005). Embora alterações *de novo* tenham sido descritas nos primeiros casos observados, há na literatura a descrição da transmissão dessa alteração citogenética para a descendência, mostrando que indivíduos portadores dessa síndrome podem ser reprodutivamente viáveis (DIGILIO *et al.*, 2009).

Alternativamente, tanto microduplicações quanto microdeleções no mesmo loco podem causar alterações fenotípicas perceptíveis no indivíduo. Em um estudo de mais de 16500 indivíduos com diagnóstico de deficiência intelectual, autismo e/ou anomalias congênitas, BRUNETTI-

PIERRI *et al.*, (2008) relataram 21 probandos com microdeleções e 15 com microduplicações envolvendo 1q21.1. Amostras parentais foram disponíveis na maioria dos casos descritos (17 dos casos de microdeleção e 12 para os casos de microduplicação). Pôde-se constatar através disso que a maioria dos casos de ambas entidades são herdadas, com apenas três microdeleções e uma microduplicação sendo *de novo*.

Similarmente a casos descritos previamente, a análise do loco associado a ambas as entidades demonstrou a presença de várias LCRs flanqueando essa região, fato que levou os autores a suspeitarem do NAHR como mecanismo relacionado aos rearranjos cromossômicos observados. Do ponto de vista clínico, os indivíduos com a microdeleção e a microduplicação descritas acima não apresentaram um padrão consistente de alterações dismórficas que pudesse ser associado a cada uma das síndromes. Entretanto, comportamentos típicos de espectro autista, ansiedade e depressão, comportamento antissocial, atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual foram sinais psiquiátricos descritos nesses indivíduos (BRUNETTI-PIERRI *et al.*, 2008).

Além disso, nota-se que os portadores da microdeleção de 1q21.1 são portadores de um perímetro cefálico consistente com o diagnóstico de microcefalia. Por outro lado, aqueles que possuem a microduplicação apresentam macrocefalia. Evidências prévias, reportadas na literatura, levaram os autores a especularem se o gene homólogo ao HYDIN (localização cromossômica: 16q22.2), que está na região em questão e tem a sua dosagem gênica alterada por ocasião dos rearranjos genômicos, possa estar associado à alteração do volume craniano, uma vez que mutações no próprio HYDIN estão associadas a formas autossômicas recessivas de hidrocefalia em modelos murinos (BRUNETTI-PIERRI *et al.*, 2008).

Semelhantemente, regiões subteloméricas têm chamado especial atenção na investigação da base molecular da deficiência intelectual, pois muitas síndromes de microdeleção atualmente catalogadas possuem a sua etiologia molecular associada a rearranjos cromossômicos envolvendo estes locos (YATSENKO *et al.*, 2009).

Nos seres humanos, os telômeros consistem de repetições de uma sequência de hexâmeros (TTAGGG)_n e possuem especial função na manutenção da estabilidade cromossômica por evitarem a perda de material genético associada a limitações da própria maquinaria de replicação do DNA. Para isso, essa região encontra-se formando alças, onde as pontas unifilamentares estão pareadas ao DNA adjacente em forma de triplex, num pareamento não Watson-Crick. Todo esse complexo é estabilizado por uma maquinaria proteica conjuntamente chamada de shelterina (SUMNER, 2003).

Adjacente aos telômeros, o DNA subtelomérico caracteriza-se por ser rico em genes e possuir sequências que variam entre 100 a 300 kb que são chamadas TARs (*telomere associated repeats*), que carregam homologia entre si. Essas regiões são também evolutivamente ativas, possuindo altas taxas de recombinação e quebras de fita dupla (DSB). Tais características tornam o DNA subtelomérico particularmente susceptível a eventos de recombinação que causem perdas ou ganos de material genômico (YATSENKO *et al.*, 2009).

As síndromes de microdeleção de 9q34 (Síndrome de Kleeftstra - OMIM 610253) e microdeleção de 1p36 (OMIM 607872) são exemplos de entidades clínicas cujo rearranjo cromossômico localiza-se no DNA subtelomérico. Indivíduos com a microdeleção de 9q34 geralmente apresentam deficiência intelectual severa, hipotonia, braquicefalia, microcefalia, defeitos cardíacos, sinofre, macroglossia e outras alterações comportamentais e morfológicas. Análises posteriores têm demonstrado que a haploinsuficiência do gene EHMT1, tanto causada pela perda do segmento cromossômico onde o gene está localizado (9q34) quanto pela presença de mutações sem sentido, são responsáveis pela síndrome de Kleeftstra (KLEEFSTRA *et al.*, 2009).

Os portadores da síndrome de microdeleção de 1p36, por sua vez, apresentam hipotonia, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, microcefalia, obesidade e dismorfismos faciais, tais como: ponte nasal baixa, hipoplasia de face média, entre outros. A análise do ponto de quebra em diferentes indivíduos tem levado a diferentes autores sugerirem genes candidatos nessa região, tais como GABRD (WINDPASSINGER *et al.*, 2002; ROSENFELD *et al.*, 2010), GNB1, PRKCZ e SKI (ROSENFELD *et al.*, 2010).

3.3.4 Formas Autossômicas de Deficiência Intelectual

Evidência proveniente da literatura estima que cerca de 800 genes possam estar relacionados à etiologia molecular da deficiência intelectual (DI). Outros autores, entretanto, consideram que tal estimativa tem subestimado a real heterogeneidade genética desse fenótipo, defendendo dessa maneira que, no genoma humano, a relação de genes autossomos associados a DI possa ser entorno de 1400 (ROPERS, 2010; RAYMOND, 2010).

Quanto maior a severidade da deficiência intelectual, mais improvável é a possibilidade do portador dessa alteração de se reproduzir. Dessa maneira, a taxa de recorrência de tais condições

depende, em grande parte, da taxa de mutação do gene em questão, fazendo com que se tenha muito mais conhecimento de genes relacionados a deficiência mental herdados de forma recessiva do que dominante (TARPEY e RAYMOND, 2006). Apesar disso, uma base molecular para Neurofibromatose, Esclerose Tuberosa e Distrofia Miotônica (todas autossômicas dominantes e relacionadas a DI de variável severidade) tem sido reportada (ROPERS, 2010).

O estudo de formas autossômicas recessivas de DI tem sido intimamente associado à caracterização de famílias raras, muitas vezes provenientes de regiões (frequentemente localizadas no Oriente Médio, Norte da África e Ásia) onde a taxa de homozigose é alta na população. Esta relativa baixa na diversidade genética é oriunda de fenômenos genético-populacionais e tradições culturais tais como efeito do fundador, baixo fluxo gênico, eventos migratórios e casamentos consanguíneos (HARTL e CLARK, 2010; TARPEY e RAYMOND, 2006).

Por tais razões o mapeamento por autozigose tem se revelado como uma estratégia poderosa para a determinação de loco em homozigose que possa eventualmente conter a mutação responsável pelo fenótipo (LANDER e BOTSTEIN, 1987). Muitas famílias tiveram a etiologia molecular da DI definida através dessa estratégia (BOND *et al.*, 2005; BOGERSHAUSEN *et al.*, 2013; MUSANTE e HOPERS, 2014) (Tabela 3).

Em famílias provenientes de populações onde casamento consanguíneo é mais incomum, formas recessivas de DI aparecerão na população como casos esporádicos, muitas vezes como heterozigotos compostos. Em um estudo recente, SHUURS- HOEIJMAKERS *et al.*, (2012), descrevem duas famílias com formas autossômicas recessivas com paraplegias espásticas e deficiência intelectual, com marcantes achados de neuroimagem, tais como hiperintensidades na substância branca e a presença de um corpo caloso anormalmente estreito. O sequenciamento do exoma de tais famílias revelou mutações heterozigotas compostas que causavam um erro de matriz de leitura no gene DDHD2, que codifica a fosfolipase A1.

Tabela 3: Genes associados a famílias cujo padrão de herança da deficiência mental é autossômico recessivo.

OMIM	Fenótipo	Origem	Gene	Mutação	Referência
614202	DI não Sindrômica	Paquistanesa	MAN1B1	E397K	RAFIQ <i>et al.</i> , 2011
611090	DI não Sindrômica	Iraniana	ST3GAL3	A13D; D370Y	HU <i>et al.</i> , 2011
614020	DI não Sindromica	População endogâmica (huteritas)	TECR	P182L	CALISKAN <i>et al.</i> , 2011
608393	DI e microcefalia	Paquistanesa Brasileira	CENPJ	E1235V, S58X	BOND <i>et al.</i> , 2005

(Adaptado de MUSANTE e ROPERS, 2014).

3.3.5 Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X

O desequilíbrio entre a razão de homens e mulheres afetados por deficiência intelectual é uma observação antiga, que remonta aos tempos da análise epidemiológica pioneira de Lionel Penrose (LAXOVA, 1998). Atualmente, sabe-se que há cerca de 30% a mais indivíduos do sexo masculino afetados por DI do que do sexo feminino. Tal observação levou autores como Lehrke (1972) a atribuírem a essas condições uma provável herança ligada ao cromossomo X. Trabalhos posteriores confirmaram a proposições prévias de tal forma que, atualmente, sabe-se que cerca de 10% dos genes localizados no cromossomo X estão associados a formas monogênicas de deficiência mental (ROERS e RAMEL, 2005; RAYMOND, 2006; GECZ *et al.*, 2009).

Essa incongruência da proporção de homens e mulheres afetados por DI e a posterior postulação da herança ligada ao cromossomo X sempre foram objeto de especulação por parte de biólogos evolutivos. Uma análise realizada por ZECHNER et al., (2011) observou que genes ligados à performance intelectual são 3,5 vezes mais frequentes no cromossomo X do que em autossomos. Essa tendência à associação continua sendo verdade mesmo quando fatores de correção para um provável viés de verificação e outros cuidados metodológicos são incluídos na análise. Tais evidências levam os autores a sugerirem que um forte processo de seleção sexual ocorreu durante a evolução do *Homo sapiens* e pode ter acarretado o rápido desenvolvimento do volume cerebral (cujo volume triplicou nos últimos 2.5 milhões de anos) e das habilidades cognitivas da espécie humana. De alguma forma, melhor desempenho intelectual passou a tornar-se objeto de seleção por parte das fêmeas em relação aos machos daquela espécie, num modelo “run-away” de seleção sexual (TURNER, 1996; ZECHNER et al., 2011).

Atualmente, deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (DILX) corresponde a um complexo grupo de mais de 150 síndromes distintas, com cerca de 100 genes descritos para estas entidades. Esse fenômeno se observa devido ao fato de diferentes síndromes serem causadas por variantes alélicas de um mesmo gene (heterogeneidade alélica). Dentro desse espectro, a Síndrome do X frágil é a forma de DILX mais comum, sendo responsável por cerca de 25% dos casos, e acometendo um em cada 4 a 6 mil homens e um em cada 8 a 9 mil mulheres (NASCIMENTO e VIANNA-MORGANTE, 2010).

A deficiência intelectual ligada ao X é subdividida em duas categorias: uma de formas síndrômicas e outra de formas não síndrômicas (Figura 2). As formas síndrômicas de DI caracterizam-se por apresentar dismorfismos, alterações metabólicas e psiquiátricas associadas ao déficit cognitivo. Já as formas não síndrômicas ou “puras” não apresentam outro sinal clínico perceptível além da DI. Esta última categoria (não síndrômica) corresponde a 2/3 dos casos de deficiência mental (Raymond, 2006; Gecz, 2009). A subdivisão da DI ligada ao cromossomo X nessas categorias baseia-se no viés clínico. Tal classificação é facilmente aplicável quando se consideram formas síndrômicas de DILX que podem ser prontamente diagnosticadas através da avaliação médica, como por exemplo, a Síndrome de Hurler (OMIM 607014), Síndrome de Coffin-Lowry (OMIM 303600) e entre outras. Condições como a Síndrome do X frágil (OMIM 300624), por exemplo, não se adequam bem a esse sistema, uma vez que a variabilidade clínica nessas doenças é bastante significativa, podendo ser confundidas com formas não síndrômicas de DI. Nesses casos, bem como nas ocasiões em que a deficiência mental é “pura”, o diagnóstico só pode

ser oferecido de maneira acurada através da caracterização molecular dos indivíduos afetados, pela identificação da alteração genética subjacente ao fenótipo (GECZ *et al.*, 2009).

Em determinadas ocasiões, observa-se também que algumas mutações que estavam previamente associadas a formas não síndrômicas de DI, caracterizam, na realidade, formas síndrômicas. Observa-se, também, que variantes alélicas de um mesmo gene podem causar ambos os subgrupos de DM. O primeiro fenômeno poderia ser exemplificado pelo gene OPHN1, que codifica a oligofrenina 1, e que foi descrito inicialmente em famílias com DM pura, mas que, após uma reavaliação, foram observadas com hipoplasia cerebelar (BILLUART *et al.*, 1998; PHILIP *et al.*, 2003). O segundo caso é notado quando se observa o gene ARX (aristaless related homeobox). Um espectro largamente variável de mutações nesse gene causam DM ligada ao X pura, Síndrome de Partington, hidrocefalia ligada ao X associada a genitália ambígua e outras condições (FRINTS *et al.*, 2002) Tais inconsistências do atual sistema de classificação irá demandar uma nova maneira de agrupar os casos de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, a partir de um sistema baseado nos genes identificados para esse complexo grupo de entidades (GECZ *et al.*, 2009).

Mais recentemente, com o advento de novas tecnologias de sequenciamento, tem se observado um esforço para o sequenciamento direto de exons dos genes localizados no cromossomo X em coortes de pacientes com DMLX com o objetivo de identificar novos genes. TARPEY *et al.*, (2009), utilizando-se de amostras de 208 indivíduos do sexo masculino afetados por DM ou de mulheres portadoras, realizaram o sequenciamento de 718 dos 829 genes do cromossomo X. A análise empregada realizou uma cobertura de 65% da sequência codificante desses genes. Esses autores relatam a descoberta de nove genes para DMLX, a saber: AP1S2, BRWD3, CUL4B, SLC9A6, UPF3B, ZDHHC9, SYP, CASK e ZNF711. Apesar disso, os autores afirmam que em apenas 53 (25%) das famílias, a etiologia molecular da deficiência intelectual foi encontrada. Entre as razões apontadas para tal circunstância foi apontadas a possibilidade de que, em algumas famílias, o padrão de herança autossômico recessivo possa ter mimetizado o padrão de herança ligado ao X, confundindo as análises. Também foi sugerido que, a não cobertura de regiões não codificantes dos genes possa ter feito com que mutações que afetam pontos de splicing ou a expressão dos genes tenham sido deixados para trás. Outras razões como a não anotação de alguns genes do cromossomo X e o fato de que alguns dos genes envolvidos nesse fenótipo não sejam codificantes de proteína também foram sugeridos.

Dentre os genes identificados, Tarpey e colaboradores observaram que alguns deles, como SYP e ZNF711 eram responsáveis por apenas 0,3% dos casos de DILX. Isso contrasta

enormemente com genes como FMR1, ARX e MECP2, que estão entre os genes mais frequentes entre casos de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X. Isoladamente, o gene FMR1 é responsável por 25% dos casos (NASCIMENTO e VIANNA-MORGANTE, 2010).

Análises de variações de número de cópias ao longo do cromossomo X também têm identificado regiões mais propensas a rearranjos genômicos que, eventualmente, podem causar DI. GECZ *et al*, (2009) apontam hotspots ao longo deste cromossomo que têm sido associados a este fenótipo. O primeiro localiza-se em Xp28 e envolveria o gene MECP2. Trabalhos anteriores demonstram um grande número de microduplicações nesse gene associado a coortes de famílias com DILX, sendo os pacientes com microdeleções portadores de uma DI mais severa que os que possuem microduplicações. É importante notar que mutações de perda de função nesse gene estão descritas para uma forma ligada ao X dominante de deficiência intelectual. Esta condição, chamada de Síndrome de Rett (OMIM 312750) afeta exclusivamente meninas, pois a perda de função nos meninos é letal. Outros hotspots de microrearranjos cromossômicos citados são Xp11.22 e Xq26.2 - 27, onde genes como o HUWE1 e SOX3 estão localizados, respectivamente.

Em uma recente reavaliação dos 106 genes até agora descritos para deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, PITON *et al.*, (2013), observaram que cerca de 10% possuem uma associação questionável a este fenótipo e outros 15 genes devem ser considerados com cuidado porque não foram descritos em outras famílias. Esses autores notaram que muitos desses genes foram identificados no passado, quando a possibilidade do sequenciamento de um grande número de cromossomos controles ainda era difícil. Muitas das variações encontradas nesses genes foram observadas com uma frequência populacional incompatível com mutações tipicamente associadas a condições monogênicas, que tende a ser baixa. Para realizar essa análise, os autores usaram o banco de dados do National Lung, Heart and Blood institute (NLHB – University of Washington), um banco de dados público de 10553 genomas humanos. Isso leva a crer que a complexa etiologia molecular da deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, mesmo depois dos enormes avanços dos últimos anos, ainda possui importantes questionamentos a serem respondidos.

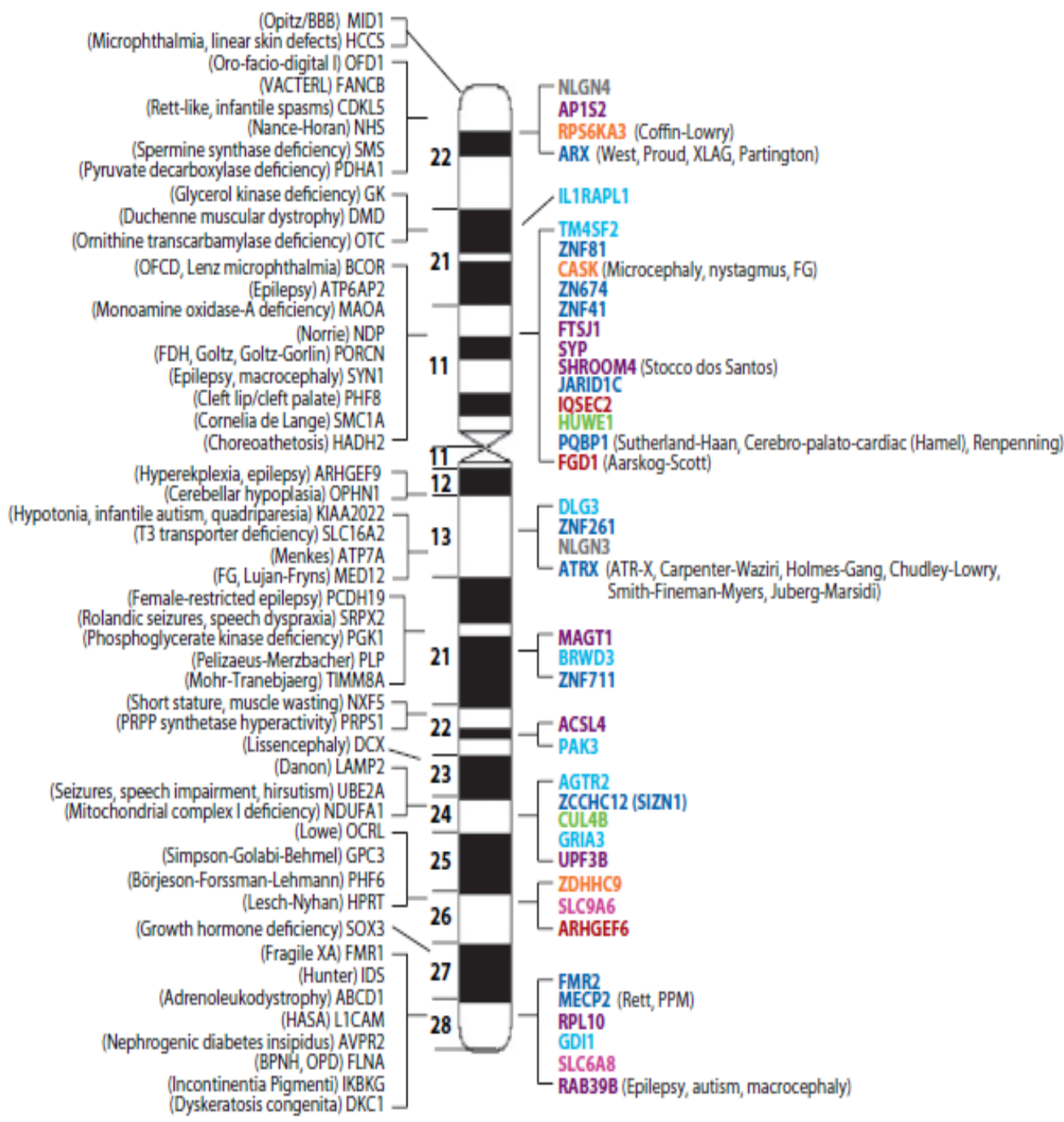


Figura 2: Representação esquemática do cromossomo X humano com alguns genes associados às formas sindrômicas (lados esquerdo e direito) e não sindrômicas (apenas lado direito) de deficiência mental. Os genes estão classificados quanto à função celular: verde (ubiquitinação), laranja (transporte de sódio), vermelho (regulação do microfilamentos de actina), cinza (adesão celular), azul escuro (regulação da transcrição), azul claro (transdução de sinal), rosa (atividade cinase, modificação pós traducional), roxo (outras alterações). Adaptado de ROPERS, (2010).

3.3.5.1 Inativação do cromossomo X e a Deficiência intelectual

A inativação do cromossomo X é um evento aleatório que ocorre durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos e que, uma vez estabelecido em uma linhagem celular, permanece inalterado. Tal processo, que é mediado pela ação em cis do gene XIST, promove o silenciamento de grandes blocos de cromatina naquele cromossomo, como uma maneira de realizar o equilíbrio da dosagem gênica em fêmeas e machos (MUERS *et al.*, 2007; ENGREITZ *et al.*, 2013).

Um processo de avaliação da inativação do cromossomo X em seres humanos foi descrito por ALLEN *et al.*, (1992). Nesse trabalho, os autores utilizaram o gene do receptor de andrógeno humano (HUMARA), localizado em Xq12, para indiretamente inferir a inativação daquele cromossomo, uma vez que este gene segue o padrão de expressão do cromossomo X em que ele está localizado. Essa avaliação só é possível porque o HUMARA é extremamente polimórfico (90% das mulheres são heterozigotas para esse gene), possuindo repetições CAG de variáveis extensões no primeiro exon. Nesse protocolo, enzimas sensíveis a sítios de metilação (HpaII e HhaI) são usadas nesse trabalho para realizar a digestão do DNA genômico, com uma posterior amplificação por PCR dos fragmentos de DNA não digeridos (ou seja, que estão metilados). Por fim, a razão entre os fragmentos amplificados é obtida. Se houver amplicons de ambos cromossomos numa igual proporção, a inativação é dita de 50:50. Caso contrário, a fêmea é dita portadora de um desvio de inativação (Figura 3).

Em um estudo envolvendo 415 mulheres de diferentes origens étnicas, AMOS-LANDGRAF *et al.*, (2006) observaram que a razão entre os cromossomos X ativos e inativos variam na população, seguindo uma curva de distribuição normal. Esses autores também notaram que um pequeno percentual das mulheres avaliadas possuía um desvio de inativação bastante conspícuo: 3,6% apresentaram um desvio de inativação de 90:10 e 1,7% delas, 95:5. Tal achado tem sido consistente com o padrão de inativação do cromossomo X de portadoras assintomáticas de condições de herança ligada ao cromossomo X (PLENGE *et al.*, 2002). Esse desvio provavelmente ocorre devido à inviabilidade funcional das células cujo cromossomo X ativado é o defectivo. Nesse caso, ocorrerá um maior povoamento tissular de células com o cromossomo X normal ativado (MUERS *et al.*, 2007).

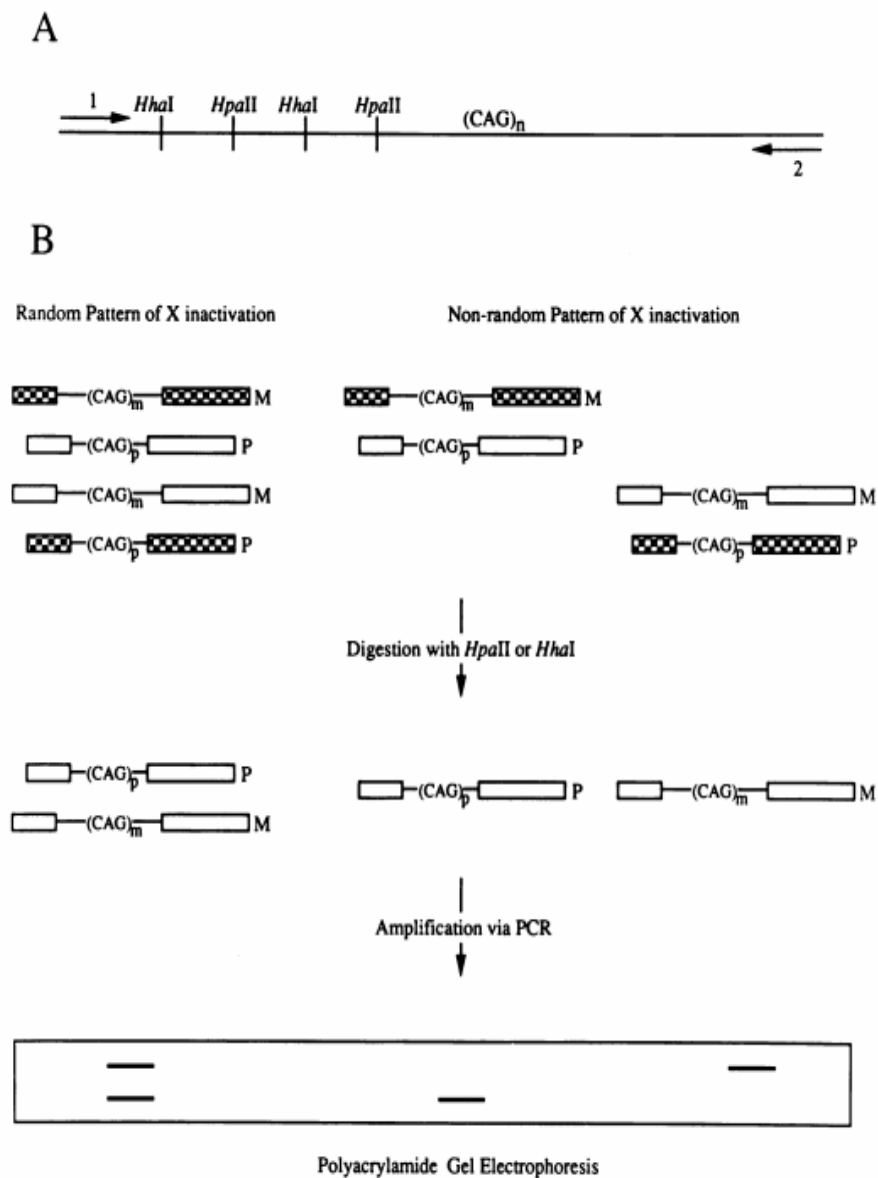


Figura 3: Diagrama representando o estudo dos cromossomos X de fêmeas cuja inativação do cromossomo X é aleatória e enviesada. Como as enzimas *HhaI* e *HpaII* apenas digerem os fragmentos desmetilados, em casos de desvio de inativação haverá um desequilíbrio na amplificação dos alelos, notada através da eletroforese em gel de acrilamida (Figura adaptada de ALLEN *et al*, 1992)

3.3.5.2 A Síndrome do X Frágil

A síndrome do X frágil é a forma de deficiência intelectual herdada mais comum, afetando 2,5 % dos homens e 1% das mulheres com DM. Clinicamente, esses indivíduos costumam apresentar alterações comportamentais, tais como déficit de atenção, hiperatividade, ansiedade, contato visual pobre e agressividade. Enquanto a deficiência mental é moderada em homens, as mulheres apresentam um grau mais variável desse fenótipo, podendo ser de indivíduos normais a portadoras de dificuldades de aprendizado, ou até mesmo portadoras de DM (25% dos casos). Dismorfismos também são recorrentes, pois os pacientes com essa condição normalmente apresentam orelhas proeminentes, palato alto, rosto alongado e prognatismo. Macrorquidismo pode ser observado após a puberdade e outras alterações como hiperextensibilidade das articulações também podem ser notadas nesses pacientes (VIANNA-MORGANTE e NASCIMENTO, 2010).

A identificação de um sítio frágil em Xq28 em meios de cultura de células pobres em folato permitiu que a Síndrome do X frágil (SXF) começasse a ter a sua base molecular compreendida. Este achado abriu caminho para que outros sítios semelhantes pudessem ser identificados ao longo do genoma humano. Atualmente, dois desses sítios são localizados no cromossomo X: FRAXA, associado à Síndrome do X frágil e FRAXE, descrito em formas esporádicas de deficiência mental. Sítios frágeis como o descrito para SXF caracterizam-se por serem regiões de replicação tardia e terem repetições em tandem de sequências CGG e AT. Tal característica permite a formação de estruturas em grampo, triplex e tetraplex (FELIX, 2010).

Atualmente, sabe-se que a etiologia molecular da SXF é uma amplificação, dentro de FRAXA, de repetições CGG que estão na região 5' UTR do gene FMR1. Indivíduos normais para essa síndrome apresentam um número normal de 6 a 50 amplificações desse trinucleotídeo. Já os portadores da doença apresentam mais de 200 repetições dessa mesma sequência. Por outro lado, pessoas que possuem entre 55 e 200 amplificações são ditas possuírem a pré-mutação do gene FMR1, podendo ter o risco de, em suas proles, haverem afetados pela síndrome do X frágil, caso haja uma posterior amplificação desse alelo instável de uma geração para outra. É importante ressaltar, entretanto, que este processo de progressão da pré-mutação para mutação completa é um evento molecular que primariamente se dá através da transmissão materna do alelo. Dessa maneira, há um risco grave de um portador premutado do sexo feminino passar a mutação completa para a sua prole, fato que não ocorre quando o indivíduo premutado é do sexo masculino. Um semelhante

mecanismo de predileção ao sexo já tem sido descrito para outras condições genéticas, como a Doença de Huntington, onde via de transmissão é paterna (NUSSBAUN *et al.*, 2010; VIANNA-MORGANTE e NASCIMENTO, 2010; FELIX, 2011) (Figura 4).

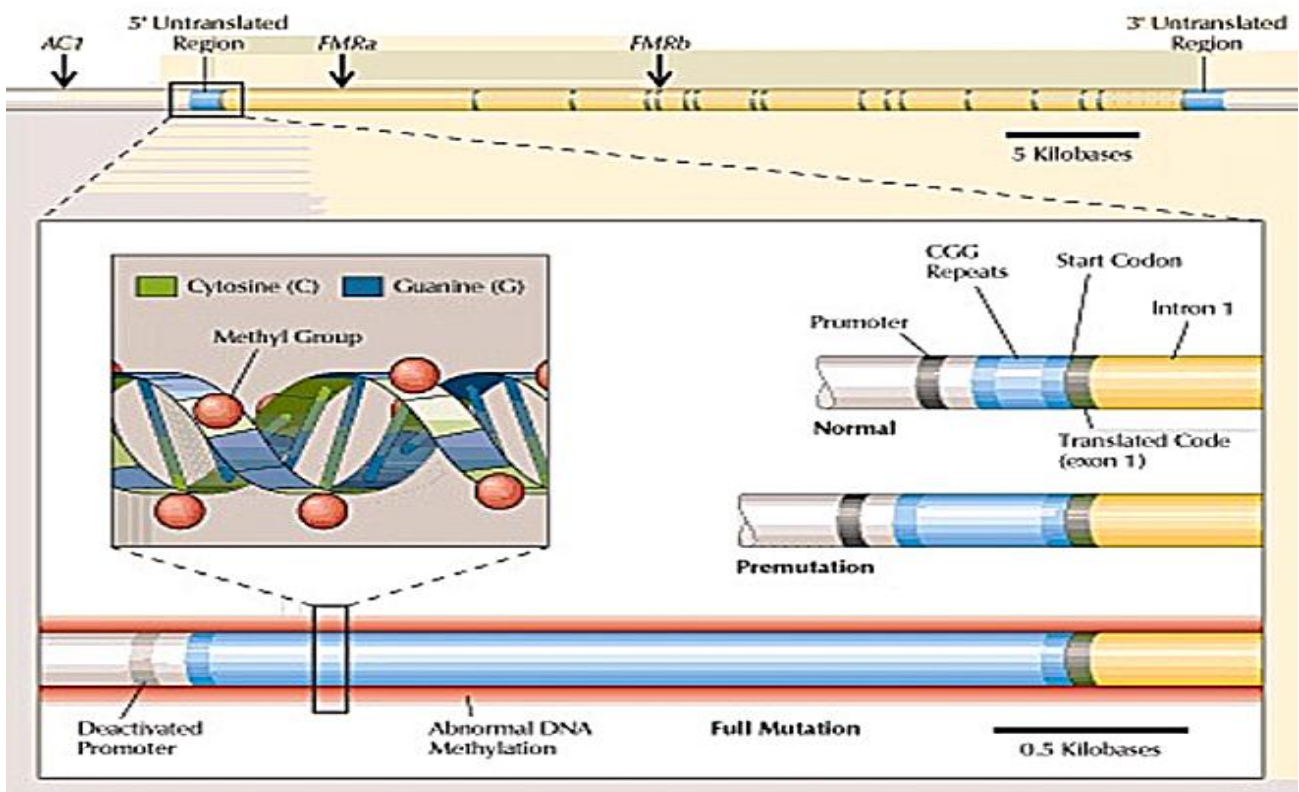


Figura 4: Ilustração das formas normal, pré-mutada e mutada do gene FMR1. (Imagem extraída do site: <http://www.fragilex.org/>, em 07.02.13).

Mais recentemente, tem se observado que indivíduos portadores da premutação têm um risco empírico de 20% de desenvolverem uma doença neurodegenerativa de início tardio (após os 50 anos) associada a ataxia e parkinsonismo chamada FXTAS (fragile x associated tremor and ataxia syndrome). Além disso, mulheres portadoras dessa expansão subclínica para x frágil também apresentam um risco de 16% de desenvolverem menopausa precoce (SMERMAN, 2000; CAPELLI *et al* ,2010).

HAGERMAN e HAGERMAN, (2013) descrevem, em um recente artigo, o esforço de diferentes pesquisadores para explicar o mecanismo molecular pelo qual as ampliações tanto da pré-mutação quanto a mutação completa originam a síndrome do X frágil, FXTAS e a menopausa precoce. Segundo esses autores, atribui-se ao transcrito do gene FMR1 pré-mutado uma função de

toxicidade celular, capaz de causar o processo neurodegenerativo descrito em FXTAS. Por outro lado, a mutação completa na SXF ocasiona a metilação da região 5' UTR daquele gene, reprimindo a sua transcrição. Tal evento tem implicações importantes em nível neuronal, uma vez que o gene FMR1 desempenha importante função na regulação e desenvolvimento da sinapse.

4. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, R.C. et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene, correlates with X chromosome inactivation. *American Journal of Human Genetics*. v.51 , p 1229 – 1239, 1992.
- AMOS-LANDRGAF, J.M. et al. X chromosome inactivation patterns in 1005 phenotypically unaffected females. *American Journal of Human Genetics*. v.79, p. 493 – 499, 2006.
- ANDRIEUX, J. et al. Genotype- phenotype correlations of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridization array: cleft palate is associated with larger deletions. *Journal of Medical Genetics*. v.44, p.537-540, 2007.
- ARADHYA, S. et al. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* v.143, p.1431-1441, 2007.
- ARTMAN, H.G.; MORRIS, C.A.; STOCK, A.D. 18p – syndrome and hypopituitarism. *Journal of Medical Genetics* v. 9, p.671 – 672, 1992.
- BATTAGLIA, A.; FILIPPI, T.; CAREY, J.C. Update on the clinical features and natural history of Wolf- Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *American Journal of Medical Genetics part C. Seminars of Medical Genetics* v.148C, p.246 – 251, 2008.
- BILLUART, P. et al. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X linked mental retardation. *Nature*. v. 6679, p. 923 – 926, 1998.
- BIRNEY, E. et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot genome project. *Nature*. v.447, p. 799 – 816, 2007.
- BOGERSHAUSEN, N. et al . Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *American Journal of Human Genetics* v. 93 p.181 – 190, 2013.
- BOND. J. et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nature Genetics* v.37 p. 353 -355, 2005.

BRKANAC, Z. et al. Identification of cryptic rearrangements in patients with 18q- deletion syndrome. *American Journal of Human Genetics*. v.62 p.1500 – 1506, 1998.

BRUNETTI-PIERRI, N. et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly and macrocephaly and developmental and behavioural abnormalities. *Nature Genetics* v.40 p.1466 – 1471, 2008.

CALISKAN, M. et al. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13 *Human Molecular Genetics* v. 20 p. 1285 – 1289, 2011.

CAPELLI, L.P. et al. The fragile X associated tremor ataxia syndrome. *Arquivos de Neuropsiquiatria* v.68, p. 791 – 798, 2010.

COLLINS, V.R. et al. Is Down syndrome a disappearing birth defect? *Journal of Pediatrics* v.152 p.20-24, 2008.

CURRY, C.J. et al. Evaluation of mental retardation recommendations of a Consensus Conference American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-477, 1997.

DALGALARROND, Paulo. Psicopatologia e semiologia de transtornos mentais. 1. Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2000. Cap. 23, p. 171-177.

DIGILIO, M.C. et al. 3q29 microdeletion a mental retardation disorder unassociated with a recognizable phenotype in two mother – daughter pairs. *American Journal of Medical Genetics part A* v. 149A, p. 1777 – 1781, 2009.

DE RAVEL, T.J.; THIRY, P.; FRYNS, J.P. Follow – up of adult males with chromosome 18p deletion *European Journal of Medical Genetics* v.48, p.189 – 193, 2005.

ENGREITZ, J.M. et al The Xist long noncoding RNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across X chromosome. *Science*.341: 1237973, 2013.

FISCH, G.S. et al. Cognitive- behavioral features of children with Wolf-Hirschhorn syndrome: preliminary report of 12 cases. *American Journal of Medical Genetics Part C Seminars in Medical Genetics*. v. 148C, p. 252 – 256, 2008.

FRINTS, S.G.M. et al. X linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clinical Genetics*. v.62, p.423 – 432, 2002.

GECZ, J.; SHOUBRIDGE, C.; CORBETT, M. The genetic landscape of intellectual disability arising from X-chromosome. *Trends in Genetics* v.25, p.308-316, 2009.

- GOULD, Stephen Jay The mismeasure of man. 1. Ed. Londres: Penguin Books, 1981. Cap. 5, p. 147 -223.
- GREENBERG, F.H. et al. Molecular analysis of the Smith-Magenis Syndrome: a possible contiguous gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *American Journal of Human Genetics* v. 49, p.1207 -1218, 1991.
- GU, H. et al. A familial cri du chat/ 5p deletion syndrome resulted from rare maternal complex chromosomal rearrangements (CCRs) and/ or possible chromosome 5 chromotripsis. *Plos One* v.8: e76985, 2013.
- FEENSTRA, I. et al. Disruption of teashirt zinc-finger homeobox 1 is associated with congenital aural atresia in humans *American Journal of Human Genetics* v.89, p. 813-819, 2011.
- HAGERMAN, R.; HAGERMAN, P. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X associated tremor/ ataxia syndrome. *The Lancet Neurology* v.12, p.786 – 789, 2013.
- HARTL, Daniel L; CLARK, Andrew G . Principios de Genética de Populações.4ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. Cap. 1, p. 29 – 30.
- HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* v.2, p. 280 – 291, 2001.
- HASSOLD, T.; HALL, H.; HUNT, P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* v.16, p. R203 – 208, 2007.
- HASTINGS, P.J. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics* v.10, p.551 – 564, 2009.
- HU, H. et al ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *American Journal of Human Genetics*. v. 89, p. 407 – 414, 2011.
- JUAN, D. et al. Late replicating CNVs as a source of new genes. *Biology Open* v.2, p.1402 -14011, 2013
- KLEEFSTRA, T.; VAN ZELTS – STAMS, W.A.; NILLESEN, W.M. Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *Journal of Medical Genetics* v.46, p.598 -606, 2009.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Homozigosity mapping; a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* v.236, p.1567 – 1570, 1987.

LAXOVA, R. Lionel Sharples Penrose, 1898 – 1972. A personal memoir in celebration of the centenary of his birthday. *Genetics* v.150, p. 1333 – 1340, 1998.

LUO, Y. et al. Diverse molecular mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Human Molecular Genetics* v.20, p.3769 -3778, 2011.

MAINARDI P.C. et al. ClinicAl and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype – phenotype correlation. *Journal of Medical Genetics* v.38, p. 151 -158, 2001.

MATTEVI, M.S. ; MIRANDA, J.A. História da citogenética clínica. In: MALUF, S.W. et al. (Org.). *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 11-16.

MCVEAN, G. What drives recombination hotspots to repeat DNA in humans? *Philosophical Transactions of the Royal Society B* v.365, p.1213 -1218, 2010.

MOOG, U. The outcome of diagnostic studies of mental retardation : considerations on the classification of the causes. *American Journal of Medical Genetics* v.138A, p.338-321, 2005.

MUERS, M.R.. et al. Defining the cause of skewed X chromosome inactivation in X linked mental retardation by use of a mouse model. *American Journal of Human Genetics*. v.80, p.1138 – 1149, 2007.

MUSANTE, L. ; ROPERS, H.H. Genetics of cognitive recessive disorders. *Trends in Genetics* v.30, p.32 – 39, 2014.

NG, S.B.et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature Genetics*. v.42, p.30 – 35, 2010.

NUSSBAUM, Robert L.; McInnes, Roderick R.; Willard, Huntington F. Thompson & Thompson *Genética Médica*. 7ª Ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2010. Casos clínicos, p. XXXIV – XXXV.

PETRY, P. et al. Clincl features and prognosis of a sample of patients with trisomy 13 (Patau Syndrome) from Brazil. *American Journal of Medical Genetics part A*. v.161A, p. 1278 – 1283, 2013.

PHILIP, N. et al. Mutations in oligophrenin-1 gene (OPHN1) cause X linked congenital cerebelar hypoplasia. *Journal of Medical Genetics*. v.40, p. 441 – 446, 2003.

PITON, A.; REDIN, C.; MANDEL, J.L. XLID – causing mutations challenged in the light of data from large scale human genome sequencing. *American Journal of Human Genetics*. v.93, p. 368 – 383, 2013.

PLENGE, R.M. et al. Skewed X chromosome inactivation is a common feature of X linked mental retardation disorders. *American Journal of Human Genetics*. v.71, p. 168 – 173, 2002.

PURVES, D et al. Neurociências. 4^a Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. Cap. 26, p. 684-685.

QUINTERO-RIVERA, F.; SHARIFI-HANNAUER, P.; MARTINEZ-AGOSTO, J.A. Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review. *American Journal of Medical genetics part A* p.152A, p.2459 – 2467, 2010.

RAFIQ, M.A. et al. Mutations in alpha 1,2 –mannosidase gene MAN1B1, cause autosomal recessive intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*. v.89, p.176 – 182, 2011.

RAYMOND, L.F. X-linked mental retardation: a clinical guide. *J Med Genet* v.43, p.193-200, 2006.

RAYMOND, F.L.; TARPEY, P. The genetics of mental retardation. *Human Molecular Genetics* v.15, p.R110 – R116, 2006

RAYMOND, F.L. Monogenic causes of mental retardation In: KNIGHT, S.J.L. (Org.). *Genetics of mental retardation*. Basel: Karger Publishers, 2010. p.89 – 100.

REGAN, R.; WILLAT, L. Mental retardation: definition, classification and etiology. In: KNIGHT, S.J.L. (Org.). *Genetics of mental retardation*. Basel: Karger Publishers, 2010. p. 16-30.

RIEGEL, M. Hibridização genômica comparativa em microarranjos ou array-CGH. In: MALUF, S.W. et al. (Org.). *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 273-279.

ROBERS, R.H. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annual Reviews of Genenomics and Human Genetics*. v.11, p.161 – 187, 2010.

ROBERS, H. H.; HAMEL, B.C.J. X linked mental retardation. *Nature Reviews Genetics*. v.6, p.46 – 57, 2005.

ROSENFELD, J.A. et al. Refinement of causative genes in monosomy 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions *American Journal of Medical Genetics part A* v.152A, p.1951 – 1959, 2010.

SHERMAN, S.L. Premature ovarian failure among X fragile permutation carriers: parent-of-origin effect? *American Journal of Human Genetics*. v.67, p.11 – 13, 2002.

SHETH, F. et al. Gain of chromosome 4qter and loss of 5pter: an unusual case with features of Cri du chat Syndrome. *Case Reports in Genetics* 153405, 2012.

SHOUBRIDGE, C. et al. Mutations in the guanine nucleotide exchange factor gene IQSEC2 cause nonsyndromic intellectual disability. *Nat Genet* v.42, p.486-488, 2010.

SCHUURS-HOEIJMAKERS, J.H.M. et al. Mutations in DDHD2, encoding an intracellular phospholipase A1, cause a recessive form of complex hereditary spastic paraplegia. *American Journal of Human Genetics* v.91, p.1073 -1081, 2012.

SCHUURS-HOEIJMAKERS, J.H.M. et al. identification of pathogenic genic variants with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *Journal of Medical Genetics* v.50, p. 802 – 811, 2013.

STEVENSON .R.E. et al. Genetic syndromes among individuals with mental retardation. *American Journal of Medical Genetics* v.123A, p.29 – 32, 2003.

STROMMAE, P. Etiology in severe and mild mental retardation: a population based study of Norwegian children. *Developmental Medicine & Child Neurology* v.42, p.76 – 86, 2000.

SUDMANT, P.H. et al Evolution and diversity of copy number variation in the great ape lineage. *Genome Research* v.23, p.1373 -1382, 2013.

SUMNER, Adrian T. Chromosomes: organization and function. 1ª Ed. Malden: Wiley Blackwell, 2003. Cap. 13, p. 159 – 170.

TARPEY, P. et al.. A systematic, large scale ressequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* v.41, p.535- 543, 2009.

TURNER, G Finding genes on X chromosome by which Homo may have become sapiens. *American Journal of Human Genetics*. v.58, p.1109 – 1110, 1996.

UCHIDA, I.; MC RAE, K.N.; RAY, M. familial short arm deficiency of chromosome 18 concomitant with arhinencephaly and alopecia congenital. *American Journal of Human Genetics* v.17, p.410 – 419, 1965.

VIANNA-MORGANTE, A.M.; Nascimento, R.M.P. Síndrome do cromossomo X frágil: importância do diagnóstico precoce na prevenção da deficiência mental. In: Kim, C.A., Albano, L.J.M., Bertola, D.R. (Org.).*Genética na Prática Pediátrica*.São Paulo: Ed. Manole, 2010. p.403 – 416.

- VISSERS, L.E.L.M.; DE VRIES, B.B.A., VELTMAN, J.A. Genomic microarrays in mental retardation : from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *Journal of Medical Genetics* v.47, p. 289 – 297, 2010.
- WATSON J. D. et al. *Biologia Molecular do Gene*. 4^a Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. Cap. 10, p. 259 – 291. (A)
- WATSON J. D. et al. *Biologia Molecular do Gene*. 4^a Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. Cap. 19, p. 613 – 640. (B)
- WISEMAN, F.K. et al. Down Syndrome – recent progress and future prospects. *Human Molecular Genetics* v.18, p. R75 –R83, 2009.
- WESTER, U. et al. Molecular and clinical characterization of individuals with 18p deletion: a genotype – phenotype correlation. *American Journal of Medical Genetics part A* v.140, p.1164-1171, 2006.
- Willatt, L. et al. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *American Journal of Human Genetics*. v.77, p.154 – 160, 2005.
- WINDPASSINGER, C. et al. The human gamma – aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: molecular characterization and tissue specific expression. *Gene* v.292, p.25 – 31, 2002.
- WHIBLEY, A. et al. Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *Am J Hum Genet* v.87, p.173-188, 2010.
- WU, J.; SPRINGETT, A.; MORRIS, J.K. Survival rate of trisomy 18 (Edwards Syndrome) in England and Wales: 2004- 2011. *American Journal of Medical Genetics part A* v.161, p.2512 – 2518, 2013.
- Yatsenko, S.A. et al. Molecular mechanisms for subtelomeric rearrangements associated with the 9q34.3 microdeletion syndrome. *Human Molecular Genetics* v.18, p.1924 – 1936, 2009.
- ZECHNER, U. et al. A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends in Genetics* v.17, p.697-701, 2001.

5. PUBLICAÇÃO: Artigo a ser considerado para publicação na revista **Arquivos em Neuropsiquiatria**: Clinical and Molecular Studies in Two Families with X Linked Intellectual Disability

Clinical and Molecular Studies in Two Families with X Linked Intellectual Disability

Danyllo Felipe de Oliveira^{1*}, José Oliveira dos Santos^{2*}, Gabriela Ferraz Leal³, Angela Maria Vianna-Morgante⁴, João Ricardo Mendes de Oliveira⁵

1: Biologist, Master's student at the Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

2: Biologist, Pos-Doctorate researcher at the Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

3: Clinical Geneticist, Fernandes Figueira's Institute of Integrative Medicine (IMIP), Recife, Brazil.

4: Professor of Human Genetics, Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

5: Professor of Neuropsychiatry, Department of Neuropsychiatry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT:

X linked intellectual disability (XLID) is a complex group of monogenic diseases, with nearly 100 identified genes, more than 20% of them with a questionable association **Objectives:** Study the genetic basis of XLID by analyzing affected families clinically and molecularly. **Method:** clinical evaluation, G banding karyotype, Southern blotting testing, array comparative genomic hybridization (a-CGH) and X chromosome inactivation pattern were performed **Results:** G banding did not identify any chromosomal alteration. The Southern blotting, however, demonstrated that family 1 presented affected individuals with either normal, premutated or carrier of the full FMR1 mutation,. Conversely, the family 2 did not present any FMR1 alteration.. A X chromosome inactivation skewing testing was performed in family two, and resulted in a 100:0 pattern, suggestive of X chromosomal inheritance. The a-CGH testing ruled out any submicroscopic alteration. Exome sequencing studies are being performed in the family 2.

Keywords: X linked Intellectual Disability, array CGH, Southern blotting, Skewed X chromosome inactivation

RESUMO: Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (DILX) é um complexo grupo de doenças com mais de 100 genes identificados, 20% destes com uma associação questionável

Objetivos: estudar a base genética de DILX através da análise clínica e molecular de famílias afetadas **Método:** avaliação clínica, exame cromossômico por bandeamento G, Southern blotting e hibridização genômica comparativa humana (a-CGH) teste para o desvio de inativação do cromossomo x foram executados. **Resultados:** Bandeamento G não identificou nenhuma alteração. Entretanto, o Southern blotting demonstrou que a família 1 apresentou indivíduos afetados tanto com expansões normais, pré-mutação e mutação completa do gene FMR1. A família 2, por sua vez, não apresentou nenhuma alteração na análise do gene FMR1. O teste para o desvio de inativação do cromossomo X, executado na família 2, demonstrou que a portadora assintomática apresenta um desvio de 100:0, sugestivo de herança ligada ao cromossomo X. O a-CGH excluiu a possibilidade de que alguma alteração cromossômica submicroscópica. Estudos de exoma estão em andamento na família 2.

Palavras-chave: Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, array CGH, Southern blotting, desvio de inativação do cromossomo X.

INTRODUCTION:

X linked Intellectual disability (XLID) encompasses a set of disorders with a remarkable degree of genetic and clinical heterogeneity. It is currently known that more than a hundred of distinguishable disorders are classified into this group and 106 genes have been associated to them, accounting for nearly 10% of X chromosome genes. Progress in this area has been massive, mainly in the past two decades. Among the factors responsible for this advance, the ones that probably have made a major impact are the fact that XLID families are more easily identified and gene mapped than families intellectual disability associated to autosomal genes ¹⁻³

It is also important to stress that the mental deficiency found in these patients affects them essentially before the age of 18 years old, a characteristic that highlights the developmental nature of these disorders ⁴.

The extent of intellectual functioning and clinical findings varies considerably among affected individuals, even when they belong to a same family, highlighting the clinical spectrum a single genetic alteration may manifest. Therefore, XLID is split conventionally in two different categories, namely, syndromic and non-syndromic X linked intellectual disability. The syndromic cases of XLID are characterized by the presence of metabolic, dysmorphic and psychiatric alterations associated to the diagnostic of mental deficiency. On the other hand, the non syndromic cases present no clinical alteration but intellectual disability. Nevertheless, is important to highlight that this dichotomic classification does not correspond to the reality evidenced by molecular diagnostic, once that many genes, such as ARX, have been associated to both syndromic (Partington Syndrome and X-linked hydrocephaly associated to ambiguous genitalia) and non syndromic XLID⁵. FMR1, a widely known gene, whose genomic triplet amplifications account for Fragile X syndrome, very often presents such a set of different clinical profiles that the affected individuals may carry dysmorphic features, autistic behaviour and other psychiatric alterations or even be only intellectually disabled, mimicking non syndromic XLID. Those findings have led some authors to speculate that a gene-based classification may be proposed in order to overcome the gaps of the current system^{6,2}.

In a recent analysis of X chromosome inactivation patterns involving 415 women from different ethnical backgrounds⁷, was observed that the ratio of inactivated and activated x chromosomes varies in human populations, following a normal distribution. These authors also noticed that a small percentage of the evaluated women had an inactivation skewing very conspicuous: 3,6% presented an inactivation ratio of 90:10 and 1,7%, 95,5. Such highly skewed patterns have been identified frequently in asymptomatic carriers of X linked genetic conditions⁸. Such phenomenon probably occurs due to the functional damage caused at cellular level by the presence of an activated defective x chromosome, which may ends up leading to cell death. In this case, there will be an overpopulation of cells expressing the normal x chromosome^{7,8}.

Aiming to identify the causative genes for XLID, some recent studies⁹ have performed a large resequencing of 718 out of 829 X chromosome genes in 208 of affected individuals or female carriers, resulting in the identification of a genetic basis for mental deficiency in 53 families (25%), even though they sequenced most part of the coding sequence (65%) of the chosen genes. These results led them to speculate about the possibility of a large proportion of XLID associated mutations are located at noncoding regions, such as, splicing sites, cis regulatory regions kilobases away from the genes and that were not covered by the adopted methodology.

Additionally, in a recent analysis of the 106 genes associated to x linked intellectual disability, other authors³ found that nearly 25% of these genes have an suspicious association to that phenotype either due the lack of reproducibility of these results in another XLID families or the questionable pathogenic status of the underlying genetic alteration. This work clearly demonstrates that the genetic basis of x linked intellectual disability, a disorder with estimated prevalence of 2% in Western countries and that has been a major cause for referral in pediatric and clinical genetic services, is far from being fully understood. Therefore, replication studies, focusing on the clinical and genetic analysis of XLID families are on high demand¹⁰.

METHODS

Blood samples from the studied individuals were collected after informed consent. They were used to DNA extraction through standard salting out procedures followed by alcohol precipitation.

After having their samples, a Southern blotting was performed, in order to evaluate the extent of FMR1 amplifications. Initially, 7 µg of DNA was placed with 7µL of Eco RI, React 3 (20µL), BSA (20µL) and water (133µL) were used to perform an enzymatic digestion, which was evaluated through an agarosis (0,7%) gel electrophoresis. Then, the same sample underwent a second round of DNA digestion, using the enzyme Eag (4µL). Following the enzymatic digestions, the samples were placed in another agarosis gel at the same concentration, and, after that, the DNA was transferred to Hybond-N papers. These were employed to the labelling of the samples with StB12.3 probes (X Fragile Syndrome locus) and ulterior revealing of the bands in a photographic film.

The X chromosome pattern of inactivation was assessed through the following procedure: an enzymatic digestion was performed using genomic DNA from the asymptomatic female carriers, using the HpaII enzyme. It is also important to highlight that the analyses were performed in pair, allowing a final comparison of the eletrophoretic graphs.

Ater the digestion, a PCR to the Human Androgen Receptor (HUMARA) gene was performed, using the primers reverse (5' TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC 3') e forward (5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT 3'). To the PCR procedure, were also employed 3,0 µL of dNTP mix (2,5mM), 0,3 µL of Taq polimerase 5U, 1,5 of MgCl₂ (50mM), 3,0 µL of 10x buffer, 3,0µL of 100 % DMSO, 12,2 µL of miliQ water and 4 µL of DNA. The PCR protocol consisted of a preheated step at 95° C during 5 minutes, followed by 28 cycles of 95°C during 45 seconds, 60°C during 30 seconds and 72° C during 30 seconds.

After the amplification step, 2 µL of PCR products were diluted in 18µL of miliQ water. 2µL of this dilution were used to the MegaBace electrophoresis, together with 3µL of an electrophoresis mix that consists of 0,3 µL of size 550 pb and 2.7 µL of tween 0,1%. The final result of the genotyping allows an assessment of X chromosome inactivation, since that, when mutilated (inative), HpaII does not cleave a restriction site at the HUMARA gene and, consequently, it is amplified. The opposite happens when the fragments are unmetilated (active).

Array CGH was performed by using 18µL of each DNA sample (DNA test and reference). Both were placed with 10 µL of random primers e 10µL reaction buffer. This material was spinned for 15 seconds at 99 and, after that, heated in a termocycler for 20 minutes at 99°C. After that, the samples were placed on ice for 5 minutes. During this period, it was added 10µL of Cy3 and Cy5 in the patient and reference samples, respectively. 1µL Klenow fragments were also added in each reaction. An incubation step at 37° C for 4 hours and 65°C during 10 minutes was performed shortly thereafter. After a centrifugation at 2000 xg and purification step, 45 µL of the sample were placed together with array slides, incubated, washed and scanned on the microarray platform. The microarray results were analysed by using public databases of copy number variation in the Human Genome on the Golden Path website - University of California San Francisco.

RESULTS

Two unrelated families, originated from the State of Pernambuco have been evaluated clinically and molecularly, in order to identify the underlying causative genetic alteration. The first family (Figure 1) comes from the city of Carpina. The proband, born to a non consanguineous couple was referred to a clinical genetic service at the age of 9 years old (born on 15.07.1984) and a pediatric diagnosis of mental deficiency.

His parents' accounts declare that since he was six months old he presents a very high irritability, crying constantly. The prenatal follow-up was performed at their hometown, from the fourth pregnancy month on, and until then, the mother did not know that she was pregnant. During this period she took thirty Nizoral® pills, due to a mycotic infection. However, she denied the consumption of any drugs, alcoholic drinks, smoking, irradiation exposure, acute infections or traumatisms. The fetal movements started to be noticed from the fifth month on, with a moderate intensity. The delivery was normal and the newborn weighted 2 kg. There is no recording of their height and cephalic circumference.

Regarding to the postnatal development of the propositus, there is the information that he started to hold his neck at the age of seven months and learned to sit down, with the adult's support. During this period, the individual did not crawl. The speech developed very slowly during this period, with only some words being noticed on the eighth month. At the age of nine years old, his speech was intelligible. During this period until the age at which he was admitted to the clinical genetic service, he had no sphincterian control. There is no recording of infectious diseases.

The physical evaluation of the individual at the age of nine years old revealed that he weighted 21 kg (p10 – 25), had a cephalic circumference of 48,5 cm (below p2). The other findings reported at this age were: presence of slightly oblique palpebral fissures, earlobes and alar cartilage hypoplasia, short philtrum and clinodactyly of the fifth finger. An re-evaluation of the propositus at the age of 19, described the cephalic circumference (CC) still below the second percentile (52 cm), confirming the previous suspicion of microcephaly. The analysis of the propositus' cousins registered a CC of 55,5 cm (p50) to the individual V-1 and 56,5 (p50) to V-7. The height and weight were found normal in the propositus (V-4) and V-7 (height 166 cm, weight 44 kg and height 166 cm and weight 84 kg, respectively). It was not possible to measure the patient V-1 due to his lack of cooperation.

The evaluation of the only affected female (V-7), aged 12 by then, noticed that she was very apprehensive, unable to read and was taking Tegretol® and Neuleptil®.

The testicles' evaluation of the propositus led to the suspicion of macroorchidism, however there was no available orchidometer to better assess this organ's size.

The last assessment, performed in 2013 and involving the four affected individuals, observed that the patient IV -1 (born on 23.02.1965) had a CC of 56 cm (p50 – 75), attended school but did not learn to read. This patient is only able to establish simple dialogues. His intellectual disability was evaluated as moderate. The propositus presented a CC of 52,5 cm (still below p2) and was 163 cm height. This patient is unable to establish dialogues and has a severe intellectual disability. On the other hand, the patient V-4, born on 28.07.1987, who was also unable to establish a dialogue and had a severe mental deficiency, presented seizures frequently. This finding led us to perform a tomography computerized (CT scan) of his head, which did not evidence any noticeable alteration that could be responsible for such phenomenon. The individual V-7, born on 05.10.1990, was 166 cm tall and presented a CC of 57,5 cm (p 98). Her mental deficiency was registered as moderate. She never learned to read, even after having studied until the third year of primary school. She is able to keep simple conversations.

G banding karyotype of the propositus did not evidence any gross numerical or structural chromosome alteration that could explain the phenotype. On the other hand, Southern blotting analyses revealed that the individuals IV-3 and IV-4 (the propositus' mother and her sister, who is mother of another affected individual) presented 3 kb fragments, a result that establishes these two individuals are carriers of FMR1 premutation. Similarly, the molecular evaluation of the propositus demonstrated 3 kb bands. On the other hand, V-4 presented 6 kb, 6,3kb and 8kb fragments, classifying this individual as a carrier of FMR1 full mutation. Finally, the patients IV-10 and V-7 (mother and sister) presented 2.8 kb and 5,2 kb fragments, a result that is characteristic of normal individuals.

The family two, was also a non consanguineous one, and comes from Olinda. The propositus (born on 11.02.1994) was admitted to the Service of Medical Genetics to clinical follow-up. He was born through a normal and premature delivery (32 weeks) and had a birth weight of 2,06 kg. There is no recording of neonatal complications and his CC and height were not measured. Regarding his psychomotor development, it was observed that he started to walk at the age of one year and four months. Despite he started attending school when he was three years old, he still has not learned to read. Physical evaluation recorded a height of 118,5 cm (below p 2,5), weight 22,5 kg (p 2,5 – 5) and head circumference of 52 cm (p 2,5 – 5). His genitalia was compatible with sex and age (13 years at the time of this clinical assessment). His mental deficiency was evaluated as severe.

Similarly, the other two affected patients (II-1 and II-2), monozygotic twins, also showed a severe intellectual disability. Both attended school for three years, but are unable to read. II -1 started to walk at the age of one year and seven months and cannot develop a dialogue, being only able to speak isolated words. H-2 started to walk at the age of one year and six months and presents the same communication deficiencies as his other brothers. Physical evaluation in II-1 observed a height of 133,5 cm (p2), weight: 27 kg (P10), CC: 54,5 cm (p50 – 75). On the other hand, his twin brother presented the following measures: height 134,5 cm (p2), weight: 28 kg (p10), e CC: 55,5 cm (p75). In both individuals, sexual development was compatible with age at the time of clinical assessment (twelve years and six months old). A CT scan was performed in both individuals, but did not evidence any brain abnormalities. No dysmorphic features were observed in any affected individuals and there is no recording of seizures or other psychiatric abnormalities in these patients.

The parents of the affected boys were also evaluated clinically. The father (35 years old at the time of evaluation) was 159 cm tall (p 2, 5), weight: 67 kg (p50 – 75). His wife (35 years old) presented: height 156 cm (p25 – p75), weight: 57 kg (p50 – 75) and CC: 54, 5 (p25 – 50).

The propositus G banding karyotype did not reveal any chromosomal alterations and the Southern blotting analysis of this same patient only presented 2,8 kb and 5,2 kb fragments, a result that excludes the diagnosis of X Fragile Syndrome to this family.

Due to the relatively low number of affected individuals in this family and the impossibility of excluding other patterns of inheritance based on clinical evidence only, it was performed an analysis of X chromosome inactivation patterns in the individual I-2. This evaluation demonstrated that, the mother of the intellectually disabled individuals bears a skewed pattern x chromosome inactivation, suggesting X linked inheritance of the mental deficiency. Besides, aiming to identify a probable microstructural alteration that could explain the studied phenotype, a comparative genomic hybridization (array-CGH) was also carried out, using the propositus' DNA sample. This array did not identify any cryptic imbalances in the genome of this patient.

DISCUSSION

Clinically, the first family presents a considerable degree of clinical variability. While some individuals are completely eumorphic (IV-1 and V-7), others presented conspicuous dysmorphic and behavioural alterations (V-1 was microcephalic and V-4 has had seizures). On the other hand, the second family does not seem to carry any other alteration but a severe intellectual disability.

Southern blotting analysis in the patients from family 1 demonstrated that there is, at least one individual who is affected by Fragile X Chromosome Syndrome (V-4). On the other hand, the propositus, who presented the premutation at this same testing, keeps having the causation of his mental deficiency unknown. This is due to the fact that premutation does not cause ID. Similarly, the individual V-7 also has an unknown causation of her intellectual disability, once that her Southern blotting analysis was normal. It is also possible that both propositus (V-1) and V-7 are mosaics for the full FMR1 mutation, presenting different levels of amplifications of this gene in different tissues or even that they are phenocopies. Another possibility is that a different x linked gene might be causing the ID in these individuals.

The results described to family 2 point that the affected individuals are associated to a non syndromic XLID. Neither G banding karyotype nor array CGH identified a chromosomal alteration that could explain this phenotype in this family. The highly skewed X chromosome inactivation of the patient's mother(100:0) supports the X linked inheritance in this heredogram, leading us to hypothesize that a point mutation located at a X chromosome gene must be responsible for the

mental deficiency in the affected individuals and awaits identification. Currently, an exome sequencing is being performed in DNA samples from the proband (II-3) and this may shed light in the molecular etiology of the intellectual disability in this family. Such analysis are very important, once that there is a current debate over the reliability of a considerable amount of XLID identified genes, a puzzle that will only be solved with replication studies^{3,10}. .

BIBLIOGRAPHY

- 1 Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006; 16: 260 – 269.
- 2 Gecz J, Shoubridge C, Corbett M. The genetic landscape of intellectual disability arising from X-chromosome. *Trends in Genetics* 2009; 25: 308-316.
- 3 Piton A, Redin C, Mandel JL. XLID – causing mutations challenged in the light of data from large scale human genome sequencing. *American Journal of Human Genetics* 2013; 93: 368 – 383.
- 4 Raymond FL. X-linked mental retardation: a clinical guide. *Journal of Medical Genetics* 2006; 43: 193-200.
- 5 Frints SG, Froyen G, Marynen P et al. X linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clinical Genetics* 2002; 62:423 – 432.
- 6 Raymond FL, Tarpey P. The genetics of mental retardation. *Human Molecular Genetics* 2006; 15: R110 – R116.
- 7 Muers MR, Sharple JA, Garrick D et al. Defining the cause of skewed X chromosome inactivation in X linked mental retardation by use of a mouse model. *American Journal of Human Genetics* 2007 ; 80: 1138 – 1149.
- 8 Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA et al. Skewed X chromosome inactivation is a common feature of X linked mental retardation disorders. *American Journal of Human Genetics* 2002; 71: 168 – 173.
- 9 Tarpey PS, Smith R, Pleasance E et al. A systematic, large scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nature Genetics* 2009; 41: 535- 543.

10 Schuurs-Hoeijmakers JHM, Vulto-Van Silfhout AT, Vissers LE et al. identification of pathogenic genic variants with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *Journal of Medical Genetics* 2013; 50: 802 – 811.

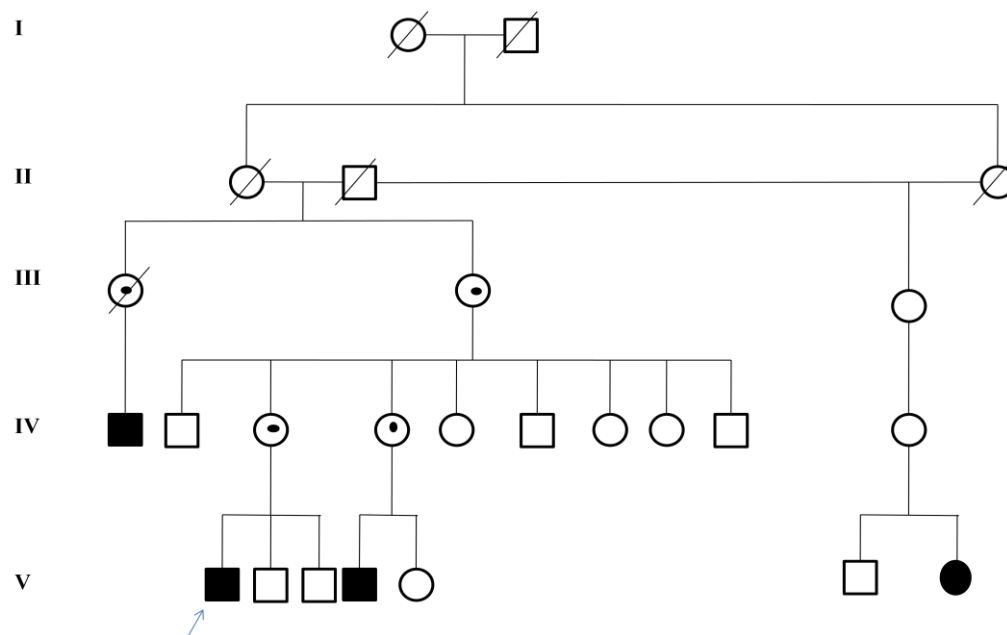


Figure 1: An esquematic representation of the heredogram of the family 1, showing four affected individuals and a high degree of clinical heterogeneity.

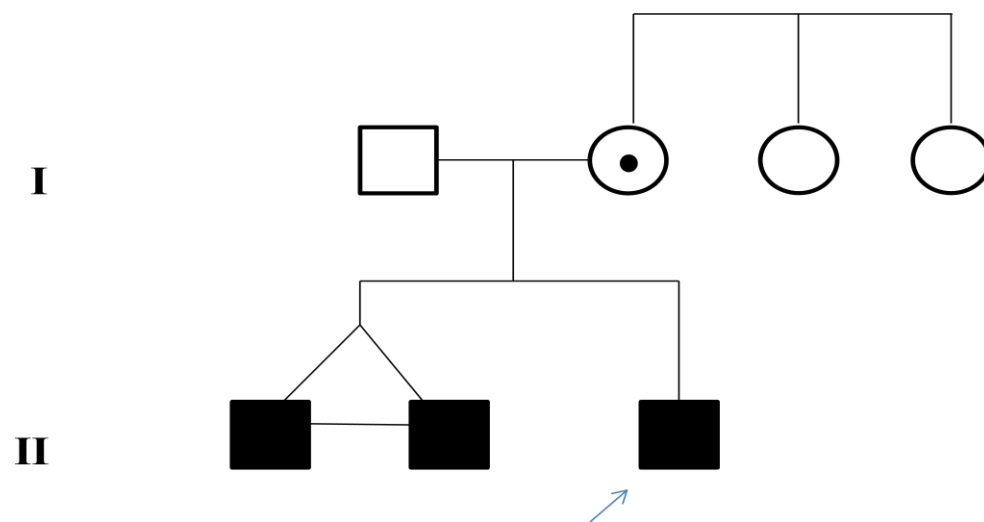


Figure 2: The depicted heredogram presents a three-affected-individuals family, with no other clinical findings but mental deficiency.

6. CONCLUSÃO

A avaliação clínica e molecular das duas famílias com deficiência intelectual ligada ao cromossomo X estudadas nesse trabalho levaram as seguintes conclusões:

- Os indivíduos da família 1 apresentaram um considerável grau de variação fenotípica, tanto no que se refere a sinais dismórficos (presença de microcefalia no indivíduo probando) e alterações psiquiátricas (surto de convulsão em V-4);
- O bandejamento G afastou a possibilidade de uma alteração cromossômica como a causa dessa deficiência mental nessa família. Entretanto, o estudo das amplificações do gene FMR1 na família 1 possibilitou realizar o diagnóstico molecular da Síndrome do Cromossomo X Frágil em, pelo menos, um indivíduo (V-4). As causas da DI nos outros indivíduos mantêm-se desconhecida. Entretanto, um mosaïcismo das alterações desse gene possam ser responsáveis pelo fenótipo em questão nos outros indivíduos. A presença de uma fenocópia também não foi excluída;
- Fenotipicamente, os pacientes afetados da família 2 são homogêneos, sendo a deficiência mental o único achado clínico perceptível nos três indivíduos.
- A análise do desvio de inativação na genitora dos afetados na família 2 fortaleceu a hipótese de que uma alteração ligada ao cromossomo X seria a causadora da DM;
- O southern blotting excluiu a possibilidade de que a DM tenha sido causada por mutações do FMR1 nos pacientes da família 2. Semelhantemente, o array CGH e o bandejamento G não identificaram quaisquer alterações citogenéticas nesses indivíduos. Tais resultados apontam para a hipótese de que uma mutação de ponto em um gene ligado ao cromossomo X possa estar relacionada ao fenótipo em questão. O sequenciamento direto do exoma dos genes ligados ao cromossomo X em um dos afetados está em andamento e pode contribuir para a identificação de um gene candidato.

.

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1: Normas da revisra “Arquivos de Neuro-psiquiatria”

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Purpose and objectives](#)
- [Form of articles](#)
- [Article's submission](#)

Purpose and objectives

The mission of Arquivos de Neuro-Psiquiatria is to provide neurologists and specialists in related fields with open access to original articles, editorials, review articles, images in neurology and didactic case discussions of clinical interest.

Its purpose is to contribute towards improving attendance for patients with neurological diseases, training for neurologists, clinical research, continuing education and practice guidance for neurologists.

Its vision is to be the best neurosciences journal in Latin America within the peer review system.

Arquivos de Neuro-Psiquiatria is the official journal of the Brazilian Academy of Neurology. It publishes its consensus and guidelines on neurology, educational and scientific material from its different departments and also guidance of interest to neurologists' professional activities.

Arquivos de Neuro-Psiquiatria publishes one volume per year, consisting of twelve monthly issues, from January to December, in two versions:

- Arq Neuropsiquiatr - ISSN 1678-4227 (online version)
- Arq Neuropsiquiatr - ISSN 0004-282-X (printed version)

TYPES OF CONTRIBUTION

Texts should present characteristics that allow them to fit into the following sections:

- Original Articles: original clinical or experimental research.
- Review Articles: critical analyses on current topics, by invitation from the editors.
- Historical Notes: history of neurology and data on descriptions of signs, diseases or neurological syndromes.
- Images in Neurology: original images that illustrate neurological diseases.

- Theses Abstracts: reproduction of abstracts from theses or master's dissertations.
- Opinions: comments on articles that have been published.
- Book Reviews: critical analysis on neuroscience publications.
- Brazilian Academy of Neurology: topics relating to the activities of the Academy's Scientific Departments, annals of scientific meetings and others.

The texts should be unpublished, clear and concise, and in English both for the *online* version and for the printed version.

The sections Book Reviews and Brazilian Academy of Neurology will be published only in printed form.

Form of articles

Arquivos de Neuro-Psiquiatria

Adopts the editorial standards of the International Committee of Medical Journal Editors: ICMJE uniform requirements submitted to biomedical journals October 2005 update (www.icmje.org).

Authors must submit the original manuscript using the **Microsoft Word** text processor, in font size 12 (Arial or Times New Roman). The text must contain, in this order:

1) **Presentation (cover page):**

- a) Title synthetic and precise, up to 100 characters. The title should be suggestive, drawing attention to the content, without being restricted to a strictly descriptive nature. Except in manuscripts referring to particular aspects of a region that cannot be extrapolated to the general population, descriptions of the region from which the study originates should be avoided in the title. The title in Portuguese should be placed after the title in English;
- b) Author: name and, on behalf, as if desired for indexing;
- c) Complementary information: **original name** of the institution in which the study was produced, with the city and country; authors' academic degrees and current positions; funding; and postal and electronic addresses for correspondence.

2) **Abstract and *Resumo*:**

- a. Articles, Review Articles, Tricks of the Trade and Historical Notes: up to 150 words, containing structured information (optional in Tricks of the Trade) regarding the reason for and purpose of the study, method, results and conclusion;
- b. Images in Neurology and Opinions do not have an Abstract or *Resumo*.

3) **Key Words or *Palabras-Clave***

- (a) Articles, Review Articles, Tricks of the Trade and Historical Notes: after the Abstract and *Resumo* or *Resumen*, **in conformity with the Health Science Descriptors** (<http://decs.bvs.br/>); please avoid other Key Words;
- (b) Images in Neurology, Opinions and Thesis Abstracts do not have Key words/*Palavras-chave*/*Palabras-Clave*.

4) **Abstract, Key words, *Resumo* or *Palabras-Clave*** : should be placed, in this order, after the name of the authors, before the text.

5) **Text**

- a) Original Articles: up to 3,000 words, excluding the references, including: introduction and purpose; method (subjects and procedures, explicit reference regarding compliance with the applicable ethical standards, including the name of the Ethics Commission which approved the study and the agreement of patients or their relatives); results; discussion; acknowledgments; references. Do not repeat in the text the data from tables and illustrations.
- b) *Review Articles*: up to 5,000 words, excluding the references, including analysis on data from other authors or meta-analysis, critical evaluation of data in the literature and remarks based on the author's personal experience.
- c) *Tricks of the Trade*: up to 1,500 words, excluding the references. This section includes short opinion statements relevant to current clinical practice and research.
- d) *Historical Notes*: up to 1,000 words, without counting the references;
- e) *Images in Neurology*: up to 100 words, with a summary of the clinical data and comments on the images.
- f) *Opinions*: up to 400 words.
- g) *Theses*: up to 200 words.

6) Tables

- a) *Original Articles* and *Review Articles*: up to 7, presented on separate pages, including: order number, title and legend. Do not use bars to separate lines or columns;
- b) *Historical Notes*: up to 4, with a format similar to that described for the articles.

7) Illustrations

- a) *Original Articles* and *Review Articles*: up to 10 graphs or photos of high , with legends on separate pages. Reproductions of published illustrations: attach authorization from the publisher;
- b) *Historical Notes*: up to 5, of high resolution (JPEG, at least 500 dpi) with format similar to that described for the articles;
- c) *Images in Neurology*: up to 8, of high resolution (JPEG, at least 500 dpi), on a single page.

Note: For illustrations in color, the authors have to consult the Manager about the costs..

8) References

- a) *Original Articles*: up to 30, limited to those that are essential to the content of the article;
- b) *Review Articles*: up to 60;
- c) *Historical Notes*: up to 10;
- d) *Opinions* and *Images in Neurology*: up to 5.

The references must:

- a) Be numbered in consecutive order of their citation over the course of the text;
- b) Follow the pattern of Index Medicus;
- c) Include all the authors when there are up to 6; when there are 7 or more, list the first 3 and follow them with "et al."

Method for making citations:

- a) Articles: Author(s). Title. Periodical; year; volume: first-last page (with all the digits);
- b) Books: Author(s) or Editor(s). Title. Edition, if it was not the first. Translator(s), if this was the case. City in which it was published: publisher, year: first-last page;
- c) Book chapters: Author(s). Title. Editor(s) of the book and other data on this, as in the preceding item;
- d) Abstracts: Author(s). Title, followed by (Abstr).

- Periodical year; volume (Supplement and its number, if this is the case): page(s).
 e) When it was not published in a periodical: Title of the publication. City in which it was published: publisher, year, page(s);
 f) Online book or text: Author(s). Title. Available at www ... (name of the site). Accessed (month, day, year);
 g) Personal communications should only be mentioned in the text, in parentheses.

The references that appear in the articles published in this issue serve as a guide.

Article's submission

MANUSCRIPT SUBMISSION

Only online submissions will be accepted: <http://mc04.manuscriptcentral.com/submission.anp-scielo.br>

The article should be submitted to the Editorial Board for publication, together with the following:

- 1) Two documents, both in PDF and **signed by all the authors**: (a) declaration of authors' consent for publication; (b) declaration of conflicts of interest;
- 2) Five (5) preferred Reviewers and its actual e-mails.
- 3) Non-accepted Reviewers.

APPRAISAL PROCEDURES APPLIED TO MANUSCRIPTS

The Editorial Board will:

- a. Apply the checklist task to verify whether articles are in the format recommended in the Instructions for Authors and whether they meet the purposes of the periodical. When these conditions are not satisfied, articles will be rejected (answer in 5 days).;
- b. Assign an Editor (answer in 2 days);
- c. Assign an Associated Editor (answer in 5 days);
- d. The tasks of picking, inviting and assigning Reviewers will be completed in 7 days (pick – 2 days; invite – 2 days; assign – 3 days)
- e. The Reviewers will submit their Scoresheet in 15 days;
- f. The Associated Editor will complete their Recommendation Task in 5 days;
- g. The final decision will be taken in 5 days;
- h. The maximum number of days for the Author to submit a revised manuscript once the 'Minor Revision'

decision has been made: 15 days;
i. The maximum number of days for the Author to submit a revised manuscript once the 'Major Revision' decision has been made: 30 days;

The author(s) can accompany the appraisal procedures on the manuscript through the same

website: <http://shhttp://mc04.manuscriptcentral.com/anp-scieloubmission.scielo.br>

ACCEPT OF THE ARTICLE

Manuscripts will be accepted in the chronological order in which they reach the final format, after fulfillment of all the stages of the appraisal procedures. **All manuscripts** will be submitted to an English-language reviewer credited by Pub Med Central (USA). **No other English-language revisions will be accepted.** The financial costs of this review will be borne by the authors.

PUBLICATION OF THE ARTICLE

- When the manuscript goes into the printing stage, after going through the layout stage, the manuscript can no longer be modified. At this stage, it may be published online in Ahead of Print (AOP) form, provided that it fits within the category of Original Article;
- Through the AOP system, access to the manuscript through the internet is guaranteed, and it can be read and cited even though it has not yet been formally published. At the time of formal publication, it will be withdrawn from the AOP system;
- The manuscript will be published simultaneously in online form and in printed form;
- It is established in advance that the authors agree:
 - a. That their manuscript will be published exclusively in this periodical;
 - b. That the copyright and permissions are transferred automatically to the publisher of the periodical;
 - c. That they assume intellectual and legal responsibility for the results and comments presented.

MAIN OFFICE AND CONTACTS

Manager: Adriana Spina França Machado.

Address: Rua Vergueiro 1421 / sala 804, Torre Sul, Ed. Top Towers Offices, 04101-000, São Paulo – SP, Brazil.

Telephones: (5511) 3884-2042 and (5511) 3149-6605

Fax: (5511) 23699721

E-mail Editors:

machado@revanp.com.br; livramento@revanp.com.br

Manager:

adriana@revanp.com.br

Secretary:

denise@revanp.com.br

to subscribe the jornal:
assinatura@revanp.com.br

[[Home](#)] [[About this journal](#)] [[Editorial board](#)] [[Subscription](#)]



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

**R. Vergueiro, 1421 sl. 804 - Ed. Top Tower Office Torre Sul
04101-000 São Paulo SP - Brasil
Tel.: +55 11 3884.2042 / 3287.6600
Fax: +55 11 2369.9721 / 3289.8879**



arq.neuropsiquiatria@terra.com.br

7.2 Anexo 2: Comprovação de submissão do artigo

ARQUIVOS DE
NEURO-PSIQUIATRIA

Clinical and Molecular Studies in Two Families with X linked Intellectual Disability

Journal:	<i>Arquivos de Neuro-Psiquiatria</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Oliveira, Danyllo; Federal Univerisity of Pernambuco, Keizo Asami Laboratory Oliveira dos Santos, José; University of São Paulo, Department of Genetics and Evolutive Biology Leal, Gabriela; Institute of Integrative Medicine Fernandes Figueira, Vianna-Morgante, Ângela; University of São Paulo, Department of Genetics and Evolutive Biology Oliveira, João; Universidade Federal de Pernambuco, Neuropsychiatry
Keyword:	X linked Intellectual Disability,, array CGH, Southern blotting, Skewed X chromosome inactivation

SCHOLARONE™
Manuscripts

7.3 Anexo 3: Artigo 1 publicado no ***Hypertension Research*** - Exaggerated blood pressure response during exercise treadmill testing: functional and hemodynamic features, and risk factors

ORIGINAL ARTICLE

Exaggerated blood pressure response during exercise treadmill testing: functional and hemodynamic features, and risk factors

Sandro G de Lima¹, Maria de FPM de Albuquerque¹, João RM de Oliveira², Constância FJ Ayres¹, José EG da Cunha², Danyllo F de Oliveira², Roberta R de Lemos², Manuela BR de Souza² and Odwaldo B e Silva³

The factors which contribute to an exaggerated blood pressure response (EBPR) during the exercise treadmill test (ETT) are not wholly understood. The association between the insertion/deletion polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and M235T of the angiotensinogen with EBPR during ETT still remains unstudied. To identify and compare the risk factors for hypertension between normotensive subjects with EBPR and those who exhibit a normal curve of blood pressure (BP) during ETT. In a series of EBPR cases from a historical cohort of normotensive individuals, a univariate analysis was performed to estimate the association of the studied factors with BP behavior during ETT. Additionally, logistic multivariate regression was conducted to analyze the joint effects of the variables. *P*-values above 0.05 were considered statistically significant. From a total of 10 027 analyzed examinations, only 219 met the criteria employed to define EBPR, which resulted in a prevalence of 12.6%. For the systolic component of the BP, hyperreactive subjects displayed a mean age and body mass index (BMI) significantly higher than the others ($P=0.002$ and <0.001 , respectively). No association was observed between the polymorphisms cited above and EBPR. An analysis of the joint effect of variables has indicated that only age ($P<0.001$) and BMI ($P=0.001$) were specifically associated with systolic BP during exercise. Age and BMI were the only factors that independently influenced EBPR during ETT.

Hypertension Research advance online publication, 23 February 2012; doi:10.1038/hr.2012.14

Keywords: exaggerated blood pressure response; genes; hypertension; risk factors

INTRODUCTION

Neither the physiopathological mechanisms involved in the way blood pressure (BP) responds to exercise, nor the factors that contribute to exaggerated BP response (EBPR) during exercise treadmill testing (ETT) are fully understood. Comparisons between normoreactive and hyperreactive patients, considering socio-demographic and clinical features, have mostly been carried out in small cohorts, using non-standard criteria, which may have significantly influenced the results. Several authors have compared small normoreactive and hyperreactive cohorts but while these groups have been assessed with regard to cholesterol, triglycerides and glucose levels, smoking habits and alcohol consumption, no differences were observed between the groups.^{1–4} However, Jae *et al.*⁵ observed statistically significant differences regarding all the above-mentioned variables (with the exception of alcohol) when comparing 8969 normoreactive and 375 hyperreactive patients.

It has been shown that responses to physical exercise vary amongst individuals, suggesting that the outcome of exercise might be affected by genetic variations.⁶ Similarly, several genes that encode for proteins

of the renin-angiotensin-aldosterone system have been shown to have a role in the aetiopathogeny of hypertension. However, there are conflicting results within the studies that have assessed the relationship between the polymorphisms in these genes and hypertension. Some analyses have shown that the D allele of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene increases the threshold of developing hypertension. On the other hand, other studies have described the I allele as being responsible for the phenotype or even a lack of association between this polymorphism and hypertension. Contradictory findings have also been described concerning an association between the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene (AGT) and hypertension.⁷ However, to date, any association between such polymorphisms and EBPR during ETT has remained unstudied.

Considering that hyperreactive individuals are four to five times more likely to develop hypertension,^{8–10} and that primary healthcare strategies have already been established as an effective prevention for this disease, understanding and developing forms of combating the risk factors that influence EBPR are fundamental for preventing hypertension and circulatory system diseases.

¹Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil; ²Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil and ³Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence: Dr SG de Lima, Rua Frei Jaboatão, 180/2802 - Torre - Recife-PE, CEP 50710-030, Brazil.

E-mail: sandrolima2002@gmail.com

Received 15 July 2011; revised 27 December 2011; accepted 11 January 2012

Therefore, the objective of this study has been to describe and compare the frequency of risk factors for hypertension (genetic and environmental), as well as the hemodynamic and functional variables of ETT among normotensive individuals who display EBPR and those with normal BP during ETT.

METHODS

This was a series of EBPR cases from a historical cohort of normotensive subjects who underwent ETT at the beginning of the study. A group, composed of individuals who presented abnormal BP behavior during exercise (Δ SBP ≥ 7.5 mm Hg per metabolic equivalent (MET) and/or systolic BP (SBP) at the peak of the exercise ≥ 220 mm Hg or Δ DBP ≥ 15 mm Hg, starting from normal BP levels at rest) was compared with another in which patients displayed normal BP during physical exercise. Any patients taking antihypertensives or any other drugs, which could potentially interfere with BP behavior or heart rate (HR), individuals undergoing diagnostic investigation for hypertension or those who even after meeting inclusion criteria, presented any thoracic discomfort or localized pain, cardiac rhythm or conduction disturbances, or any suspicion of electrocardiographic alterations of myocardial ischemia, patients who presented pulmonary congestion or bronchospasm during ETT and those who did not reach submaximal HR during exercise, were all excluded from the study. The BP behavior under exercise was analyzed as a dependent variable. Genetic polymorphism and classic risk factors for hypertension (diabetes mellitus; DM, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, patients whose immediate relatives have been affected by hypertension, skin color and body mass index; BMI) were analyzed as independent variables. Furthermore, the analysis was stratified considering the EBPR subgroups: reactive hypertensive individuals through the systolic component (SRH) and reactive hypertensive individuals through the diastolic component (DRH).

The study protocol was approved by the CPqAM-FIOCRUZ ethics committee and all participants signed the terms of consent.

The ETT analysis was conducted by one single physician, using the ramp protocol.¹¹ BP was measured, both at rest and during exercise, using a mercury sphygmomanometer. Measurements were taken at regular 3-min intervals during the exercise phase and during the first, second, fourth and sixth minutes of the recovery phase. For SBP, phase '1' of the Korotkoff sounds was considered and for diastolic BP (DBP) phase '5'.

All patients enrolled on this study were sent to a clinical analysis laboratory, where blood samples were collected and DNA was extracted with standard salting out protocols. The genomic region of the polymorphisms considered for investigation during this study were amplified by PCR with the following primers for AGT FW 5'-GGA AGG ACA AGA ACT GCA CCT C-3' and RV 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'¹² and for ACE FW 5'-CYG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' and RV 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'.¹³ To verify the ACE allelic distribution throughout the cohort, 1.5% agarose was employed. After amplifying the AGT region of interest, PCR products were purified enzymatically, using exoquinase and shrimp alkaline phosphatases. Following this, the purified products were sequenced in a MegaBACE 1000. Univariate analysis was conducted in order to evaluate the association of each independent variable with BP behavior during ETT. Multivariate logistic regression was carried out to evaluate the joint effect of the variables. Results that presented descriptive levels (*P*-value) below 0.05 were considered statistically significant. Hardy-Weinberg equilibrium was also tested and the χ^2 test was employed to verify if the allelic frequencies were in accordance with those predicted by the equation. A possible occurrence of selection bias in this study could be minimized as long as the normoreactive and hyperreactive individuals were selected from the same population. Memory and information bias may have occurred during data collection concerning lifestyle and morbid antecedents, particularly self-reported hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and DM, which were not measured by biochemical tests.

RESULTS

From the 10027 analyzed examinations, only 219 were identified as hyperreactive, which therefore yielded a prevalence of 12.6%.

SBP and diastolic BP (DBP) at rest, at the height of exercise and the pressure variation between rest and exercise, are presented in Table 1.

DBP variation from dorsal decubitus position to orthostatic position was greater in hyperreactive individuals than normoreactive (5.7 vs. 2.3 mm Hg, $P < 0.001$). However, the same behavior was not observed with regard to SBP (5.7 vs. 3.9 mm Hg, $P = 0.140$). With respect to HR, it was observed in the hyperreactive group that the variation associated to posture change was 11.2 bpm, whereas in the normoreactive group this variation was 9.9 bpm ($P = 0.266$).

The HR at rest for the hyperreactive individuals both in the orthostatic or dorsal decubitus positions was similar to the normoreactive group ($P = 0.992$ and 0.663 , respectively). On the other hand, the HR measured at maximum exercise was significantly lower in the group that displayed EBPR throughout the systolic component of the BP ($P < 0.001$). Both the groups displayed a decrease in HR during the first minute of recovery time above 12 bpm. However, in SRH, the decrease was significantly greater ($P < 0.001$).

The ergometric treadmill ramp inclinations, speeds, maximum oxygen consumption (VO_2) and equivalent metabolic rates achieved by SRH individuals were significantly lower than the normoreactive individuals, as shown in Table 2.

Information concerning the risk factors for hypertension, SRH and DRH among the normoreactive individuals, collected on entering the cohort is presented in Table 3.

Table 1 Systolic blood pressure

Blood pressure (mm Hg)	Normoreactive group (111)	Systolic hyperreactive group (41)	Diastolic hyperreactive group (67)	P-value ^a
SBP lying	114.6	120.6	115.4	0.002 ^a
SBP standing	118.6	126.5	121.0	0.001 ^a
SBP maximum effort	165.9	211.1	176.6	<0.001 ^a
SBP variation (mm Hg per MET)	4.1	9.2	4.8	<0.001 ^a
DBP lying	75.9	76.3	73.3	0.065
DBP standing	78.2	80.6	80.4	0.131
DBP maximum effort	71.8	82.1	92.2	<0.001 ^a
DBP variation (mm Hg per MET)	-3.0	6.2	19.3	<0.001 ^a

Abbreviations: DBP, diastolic blood pressure, SBP, systolic blood pressure.

^aANOVA test.

Diastolic blood pressure and blood pressure variation from rest to maximum exercise in normoreactive and hyperreactive individuals. Recife, 2010.

Table 2 ETT variables in normoreactive and hyperreactive groups

ETT variables	Normoreactive group (111)	Systolic hyperreactive group (41)	Diastolic hyperreactive group (67)	P-value ^a
Maximum slope	14.9	13.6	15.2	<0.001 ^a
Maximum speed	7.3	6.0	7.3	<0.001 ^a
Time of maximum exercise	9.8	9.6	10.0	0.375
Maximal VO_2	45.5	36.5	45.8	<0.001 ^a
Maximal MET	13.0	10.4	13.1	<0.001 ^a
Maximal double product	29042.6	34188.7	30646.9	<0.001 ^a

Abbreviation: ETT, exercise treadmill testing.

^aANOVA test.

Recife, 2010.

Table 3 Univariate analysis of the association between the classical risk factors for hypertension in normotensive and the hyperreactive individuals

Variables	BP behaviour at exercise			P-value
	NR	SRH	DRH	
Gender				
Male	49 (49.5%)	19 (19.2%)	31 (31.3%)	0.950 ^a
Female	62 (51.7%)	22 (18.3%)	36 (30%)	
Skin colour				
White	69 (48.3%)	30 (21%)	44 (30.8%)	0.448 ^a
Non-white	42 (55.3%)	11 (14.5%)	23 (30.3%)	
Hypertension history				
Yes	73 (51.4%)	19 (13.4%)	50 (35.2%)	0.011 ^a
No	38 (49.4%)	22 (28.6%)	17 (22.1%)	
Age (years) average	41.7 (18–69)	55.7 (26–76)	43.3 (18–70)	0.002 ^b
BMI (Kg m ⁻²) average	24.6 (16.2–38.5)	27 (16.8–35.2)	25.3 (16.2–33.3)	<0.001 ^b
Diabetes mellitus				
Yes	4 (50%)	3 (37.5%)	1 (12.5%)	0.270 ^a
No	107 (50.7%)	38 (18%)	66 (31.3%)	
Hypercholesterolemia				
Yes	12 (52.2%)	6 (26.1%)	5 (21.7%)	0.493 ^a
No	99 (50.5%)	35 (17.9%)	62 (31.6%)	
Hypertriglyceridemia				
Yes	6 (50%)	3 (25%)	3 (25%)	0.852 ^a
No	105 (50.7%)	38 (18.4%)	64 (30.9%)	

Abbreviations: BMI, body mass index; DRH, reactive hypertensive individuals through the diastolic component; SRH, reactive hypertensive individuals through the systolic component.

^a χ^2 test.

^bStudent's *t*-test.
Recife, 2010.

Table 4 Genotypic distribution of the *ACE* gene between the normoreactive and hyperreactive individuals

Genotypes	Normoreactive (111) (%)	Systolic hyperreactive (41) (%)	Diastolic hyperreactive (67) (%)	P-value ^a
I/I	17 (48.6)	6 (17.1)	12 (34.3)	0.912
I/D	53 (52.5)	17 (16.8)	31 (30.7)	
D/D	41 (49.4)	18 (21.7)	24 (28.9)	
Alleles				0.707
I	87 (50.9)	29 (17.0)	55 (32.2)	
D	135 (50.6)	53 (19.9)	79 (29.6)	

Abbreviation: ACE, angiotensin-converting enzyme.

^a χ^2 test.

Recife, 2010.

Table 5 Genotypic and allelic distributions of the *AGT* gene in normoreactive and hyperreactive individuals

Genotypes	Normoreactive group (111) (%)	Systolic hyperreactive group (41) (%)	Diastolic hyperreactive group (67) (%)	P-value ^a
T/T	27 (45.0)	12 (20.0)	21 (35.0)	0.286
T/C	52 (47.7)	23 (21.1)	34 (31.2)	
C/C	32 (64.0)	6 (12.0)	12 (24.0)	
Allelic				0.156
T	106 (46.3)	47 (20.5)	76 (33.2)	
C	116 (55.5)	35 (16.8)	58 (27.8)	

Abbreviation: AGT, angiotensinogen.

^a χ^2 test.

Recife, 2010.

The I/D polymorphisms of the *ACE* gene and M235T of the *AGT* were also investigated as risk factors for EBPR. Neither the allelic or genotypic distribution revealed any statistically significant difference between the groups (Tables 4 and 5).

The joint effect of the *AGT* and *ACE* polymorphisms on the BP during ETT was also assessed in this population. No statistically significant difference in the haplotypic distribution between the normoreactive and hyperreactive groups was observed (Table 6).

The analysis of the joint effect of variables, a family history of hypertension, BMI and age upon the BP response to exercise, was conducted through a multinomial logistic model, where the reference category was the normoreactive group. This analysis has shown that only age ($P < 0.001$) and BMI ($P = 0.001$) were associated with BP behavior during physical exercise. Table 7 shows that the association between age and BMI occurred specifically with the systolic component of the BP during exercise. No association was observed between the I/D polymorphisms of the *ACE* gene and M235T *AGT* with EBPR (Table 8), even after having controlled the variables age and BMI.

DISCUSSION

Although the physiopathological effects involved in EBPR are not completely understood, the attributed risk for this condition to develop hypertension may be based on findings, which suggest that cardiovascular reactivity, by itself, brings negative outcomes, even in

the absence of the clinically manifested disease.^{14,15} Studies that have assessed the endothelial function of patients with EBPR have shown a significant reduction of endothelium-dependent vasodilatation capacity.^{3,16,17} These studies corroborate the hypothesis that the cardiovascular system of hyperreactive individuals worked with normal cardiac output (CO) and an increase in peripheral vascular resistance (PVR), although the normoreactive individuals responded to physical exercise with an increase of CO and a reduction in PVR. Other hypotheses have been suggested among other factors: inflammatory mechanisms,¹⁸ neurohumoral^{3,15} and poor physical condition.^{15,19,20}

The higher prevalence of EBPR encountered in the present study (12.6%) in relation to that reported in the literature may be partly justified by the very stringent criteria adopted by the study in order to define EBPR, which caused the denominator to suffer an expressive reduction. Many patients were excluded in spite of having presented with EBPR, because they also had other conditions that did not meet the criteria for defining EBPR, such as abnormal BP at rest, baseline hypertension, were taking medications that could interfere with the BP behavior during exercise, felt pain or discomfort during ETT that could trigger high BP among others. The exclusion of these patients enabled us to select only the patients who presented with EBPR without any association with other non-related conditions. Jae *et al.*¹⁸ reported a prevalence of 4.1%; however, EBPR was defined as a higher SBP ≥ 210 mm Hg, and did not take into account either the amount

Table 6 Association between I/D polymorphisms of ACE and M235T of AGT with exaggerated BP response

ACE+AGT haplotypes	BP response during ETT						P-value ^a
	NR		SRH		DRH		
	N	%	N	%	N	%	
I/I+T/T	4	44.4	3	33.3	2	22.2	0.293
I/I+T/C	12	57.1	7	33.3	2	9.5	
I/I+C/C	4	80.0	1	20.0	0	0.0	
I/D+T/T	13	52.0	5	20.0	7	28.0	
I/D+T/C	23	47.9	7	14.6	18	37.5	
I/D+C/C	16	57.1	3	10.7	9	32.1	
D/D+T/T	10	38.5	4	15.4	12	46.2	
D/D+T/C	17	42.5	9	22.5	14	35.0	
D/D+C/C	12	70.6	2	11.8	3	17.6	

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; AGT, angiotensinogen; BP, blood pressure; DRH, reactive hypertensive individuals through the diastolic component; ETT, exercise treadmill testing; SRH, reactive hypertensive individuals through the systolic component.

^a χ^2 test: P-value obtained by Monte Carlo simulation.
Recife, 2010.

Table 7 Association between age and BMI and the systolic and diastolic BP components during ETT

BP behaviour during ETT	Age		BMI	
	Odds	Valor P ^a	Odds	Valor P ^a
DRH vs. NR	1.01	0.405	1.05	0.252
SRH vs. NR	1.10	<0.001	1.22	0.001
SRH vs. DRH	1.09	<0.001	1.17	0.011

Abbreviations: BMI, body mass index; BP, blood pressure; DRH, reactive hypertensive individuals through the diastolic component; ETT, exercise treadmill testing; SRH, reactive hypertensive individuals through the systolic component.

^aWald's test.
Recife, 2010.

of physical exercise performed or the DBP. Sharabi *et al.*²¹ considered EBPR with higher SBP and DBP levels of above 200 mmHg and 100 mmHg, respectively. These authors found a prevalence of 6.3%. The lack of homogeneity to define EBPR may have been one of the factors influencing the prevalence variation reported in other studies.

The present study observed that SBP levels at rest, and BP and HR variations between the lying position to orthostatic, were higher in hyperreactive individuals than in normoreactive individuals. It has been demonstrated that BP levels of hyperreactive individuals, in random measures, at rest, are significantly higher than those of normoreactive individuals.^{2,21} Rostrup *et al.*²² reported that normotensive subjects with higher tension levels at rest, show an increase in vascular reactivity to mental stress and a consistent correlation with cardiovascular risk factors. Diwan *et al.*,²³ also verified that the BP of hyperreactive individuals at rest were in the pre-hypertension category of the VII Joint National Committee.

It is possible that sympathetic tonus, assessed by HR at rest, is similar between the groups, as there was no difference in the HR at rest between the hyperreactive and normoreactive subjects. The fact that hyperreactive individuals presented a lower HR at the peak of physical exercise when compared with the normoreactive individuals, may be explained by an early interruption of the examination due to EBPR, or indeed a shorter exercise period (no statistically significant difference). Both factors cited above might also be influenced by

Table 8 Analysis of the association among the I/D polymorphisms of the ACE gene and M235T AGT with age and BMI, in individuals with EBPR

	OR (CI 95%)	P-value! ^a
DRH vs. NR		
ACE: ID vs. II	0.84 (0.11, 1.57)	0.696
ACE: DD vs. II	0.81 (0.08, 1.54)	0.648
Age	1.01 (0.99, 1.04)	0.391
BMI	1.05 (0.96, 1.14)	0.259
SRH vs. NR		
ACE: ID vs. II	0.74 (−0.18, 1.66)	0.638
ACE:DD vs. II	0.99 (−0.25, 2.23)	0.986
Age	1.11 (1.07, 1.15)	<0.001
BMI	1.23 (1.09, 1.37)	<0.001
DRH vs. NR		
AGT: TC vs. TT	0.82 (0.23, 1.41)	0.588
AGT: CC vs. TT	0.46 (0.05, 0.87)	0.088
Age	1.01 (0.99, 1.04)	0.357
BMI	1.05 (0.96, 1.15)	0.243
SRH vs. NR		
AGT: TC vs. TT	0.76 (0.02, 1.50)	0.584
AGT: CC vs. TT	0.35 (−0.08, 0.78)	0.096
Age	1.11 (1.07, 1.15)	<0.001
BMI	1.23 (1.09, 1.37)	<0.001

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; AGT, angiotensinogen; BMI, body mass index; CI, confidence interval; DRH, reactive hypertensive individuals through the diastolic component; EBPR, exaggerated blood pressure response; OR, odds ratio; SRH, reactive hypertensive individuals through the systolic component.

^a χ^2 test.
Recife, 2010.

physical characteristics such as age and BMI, which were significantly higher in the hyperreactive group. It has been described that limitrophe hypertensive subjects present EBPR and a faster HR as a response to several stress factors, in comparison with normotensive subjects.¹⁴ This could permit us to suggest that if the exercise had not been interrupted, either because of EBPR or functional limitations, the hyperreactive group would have been expected to present a higher peak HR than the normoreactive group (NR).

The slow decrease of the HR from the peak of the exercise to the first minute of recovery has been associated to a more increased risk of cardiovascular events.^{24,25} It was observed, in both groups, that the decreasing HR in this period of the ETT was over 12 bpm; however, in the SRH group, this decrease was significantly more accentuated. A possible explanation for this finding might be encountered in the BP regulation mechanisms. In individuals with a normal BP response to exercise, an elevated SBP during exercises such as swimming, walking, cycling, among others, may occur proportionally to the amount of effort. A decreased PVR is balanced by an increase in CO as a way of preventing BP reductions. EBPR individuals present higher PVR during exercise; thus, it is possible that the mechanism of BP self-regulation occurs exactly opposite to that which takes place in normoreactive individuals. As a form of compensating for the higher PVR, these individuals would show a more accentuated decrease in HR, which in turn, would directly influence the CO and consequently, the BP. This hypothesis is enhanced by the finding of lower maximum VO₂ in the SRH group as compared with the normoreactive group. Among the factors that restrain a greater VO₂ more expressively, it is

possible to highlight the CO, which in turn is influenced by HR and systolic volume.²⁶

The evaluation of the metabolic and functional variables of the ETT allows us to conclude that SRH individuals present a lower metabolic and functional performance to that of normoreactive individuals. It is likely that age and BMI, significantly higher in the former group, may explain the ETT performance-related differences. Takamura *et al.*²⁷ evaluated the ventricular function by echocardiogram in patients with and without EBPR during exercise, and concluded that, even in the absence of hypertension, hyperreactive individuals displayed diastolic dysfunction and, as a consequence, an intolerance to exercise. Sharabi *et al.*²¹ reported that the time hyperreactive individuals spent undergoing ETT was significantly shorter than in the control group.

With regard to the classic risk factors for hypertension, our results do not reveal any difference between the normoreactive and hyperreactive individuals in relation to gender and skin color. Other studies have also shown no differences in these variables, even between the normotense and hypertense groups.^{28–32} Knowing that alterations provoked in the blood vessels by DM and deslipidemia gradually settled down, associated to the fact that there is no available information concerning the time of diagnosis of these risk factors in each of the individuals, it is possible to justify the lack of association in our results. Sharabi *et al.*²¹ found no difference in blood glucose levels, total cholesterol and triglyceride levels between the normoreactive and the hyperreactive groups.

The higher prevalence of isolated systolic hypertension observed in the elderly is well described in the literature.³³ Although the mean age of the SRH subjects, at the time of undertaking ETT, did not allow us to classify them as elderly, this was significantly higher in this group than in the DRH and normoreactive groups. Thus, the effect of the age variable on the SBP during exercise is in accordance with the currently available information in the literature regarding the relationship between age and hypertension. The gradual loss of vessel elasticity and, the consequent reduction in vasodilatation capacity might explain our results. In this sense, Chang *et al.*³ showed that the vasodilatation extension was proportionally opposite to age and SBP variation.

Excess weight is related to an increase in PVR; thus, some research has shown a directly proportional relationship between weight gain and high BP.³⁴ In the present study, it has been shown that the SRH group presented a BMI significantly higher than the normoreactive and DRH groups, which may justify *per se* the association between BMI and SRH. Widgren *et al.*³⁵ reported that individuals with a family history of hypertension have a greater reactivity to physical and mental stress than those with none at all. Diwan *et al.*²³ and Sharabi *et al.*²¹ reported that the number of individuals with EBPR was significantly greater in those who had hypertensive relatives compared with those who did not. It is possible that our results were biased, as information was collected directly with the participants of the cohort, therefore, relatives were not directly examined.

No studies have been found in the literature that have analyzed the association between genetic polymorphisms and EBPR. Some have reported the influence of determined genes during physical exercise;⁶ however, they have not specifically evaluated BP during exercise. It was decided to study the I/D ACE and M235T AGT polymorphisms owing to the current controversy in the literature with respect to the real relation between such polymorphisms and hypertension.⁷ In this study, no association was identified between the I/D polymorphisms of ACE and M235T of AGT with EBPR. However, it is possible that this association exists in populations where there is an association between these polymorphisms with hypertension, considering that

EBPR is a pre-clinical stage of hypertension. There is a need to investigate this hypothesis in further studies.

In summary, only age and BMI independently influenced EBPR during ETT. If therefore age and BMI are risk factors for EBPR and if this is a risk marker for hypertension, then preventive strategies may be applied with greater emphasis to patients who present EBPR rather than those with normal BP during exercise, even though they present above-normal BMI and are more advanced in years. In other words, identifying the risk factors in individuals who have markers of the disease (pre-clinical stages) is of even greater importance, as they are individuals who have no overt signs of the disease, although they are actually in the process of developing the disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by FACEPE.

- 1 Miyai N, Arita M, Morioka I, Takeda S, Miyashita K. Ambulatory blood pressure, sympathetic activity, and left ventricular structure and function in middle-aged normotensive men with exaggerated blood pressure response to exercise. *Med Sci Monit* 2005; **11**: 478–484.
- 2 Oliveira LB, Cunha AB, Martins WA, Abreu RFS, Barros LSN, Cunha DM, Nóbrega ACL, Martins-Filho LR. Monitorização ambulatorial da pressão arterial e pressão casual em hiperreatores ao esforço. *Arq Bras Cardiol* 2007; **88**: 565–572.
- 3 Chang HJ, Chung J, Choi SY, Yoon MH, Hwang GS, Shin JH, Tahk SJ, Choi BI. Endothelial dysfunction in patients with exaggerated blood pressure response during treadmill test. *Clin Cardiol* 2004; **27**: 421–425.
- 4 Shim CY, Ha JW, Park S, Choi EY, Choi D, Rim SJ, Chung N. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with augmented rise of angiotensin II during exercise. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**: 287–292.
- 5 Jae SY, Fernhall B, Heffernan KS, Kang M, Lee MK, Choi YH, Hong KP, Ahn ES, Park WH. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with carotid atherosclerosis in apparently healthy men. *J Hypertens* 2006; **24**: 881–887.
- 6 Oliveira EM, Alves GB, Barauna VG. Sistema renina-angiotensina: interação gene-exercício. *Rev Bras Hipertens* 2003; **10**: 125–129.
- 7 Lima SG, Hatagima A, Silva NLCL. Sistema Renina-Angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à Hipertensão? *Arq Bras Cardiol* 2007; **89**: 427–433.
- 8 Miyai N, Arita M, Morioka I, Miyashita K, Nishio I, Takeda S. Exercise BP response in subjects with high-normal BP: exaggerated blood pressure response to exercise and risk of future hypertension in subjects with high-normal blood pressure. *J Am Coll Cardiol* 2000; **36**: 1626–1631.
- 9 Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I. Blood pressure response to heart rate during exercise test and risk of future hypertension. *Hypertension* 2002; **39**: 761–766.
- 10 Andrade J. II DIRETRIZES da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre teste Ergométrico. *Arq Bras Cardiol* 2002; **78** (Suppl 2): 1–17.
- 11 Myres J, Froelicher VF. Exercise testing: procedures and implementation. *Cardiol Clin* 1993; **11**: 109–213.
- 12 Araújo MS, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio. *Rev Assoc Med Bras* 2005; **51**: 164–169.
- 13 Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphism: association with early coronary disease. *Cardiovascular Res* 1998; **40**: 375–379.
- 14 Everson SA, Kaplan GA, Goldberg DE, Salonen JT. Anticipatory blood pressure response to exercise predicts future high blood pressure in middle-aged men. *Hypertension* 1996; **27**: 1059–1064.
- 15 Marsaro EA, Vasquez EC, Lima EG. Avaliação da pressão arterial em indivíduos normais e hiperreatores. Um estudo comparativo dos métodos de medidas casual e da MAPA. *Arq Bras Cardiol* 1996; **67**: 319–324.
- 16 Stewart KJ, Sung J, Silber HA, Fleg JL, Kelemen MD, Turner KL, Bacher AC, Dobrosielski DA, DeRegis JR, Shapiro EP, Ouyang P. Exaggerated exercise blood pressure is related to impaired endothelial vasodilator function. *Am J Hypertens* 2004; **17**: 314–320.
- 17 Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Exercise blood pressure and endothelial dysfunction in hypertension. *Int J Clin Pract* 2009; **63**: 202–206.
- 18 Jae SY, Fernhall B, Lee M, Heffernan KS, Lee MK, Choi YH, Hong KP, Park WH. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with inflammatory markers. *J Cardiopulm Rehabil* 2006; **26**: 145–149.

- 19 Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I, Takeda S. Antihypertensive effects of aerobic exercise in middle-aged normotensive men with exaggerated blood pressure response to exercise. *Hypertens Res* 2002; **25**: 507–514.
- 20 Bond V, Millis RM, Adams RG, Oke LM, Enweze L, Blakely R, Banks M, Thompson T, Obisesan T, Sween JC. Attenuation of exaggerated exercise blood pressure response in African-American women by regular aerobic physical activity. *Ethn Dis* 2005; **15** (Suppl 5): S5–13.
- 21 Sharabi Y, Ben-Cnaan R, Hanin A, Martonovitch G, Grossman E. The significance of hypertensive response to exercise as a predictor of hypertension and cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 2001; **15**: 353–356.
- 22 Rostrop M, Westheim A, Kjeldsen SE, Eide I. Cardiovascular reactivity coronary risk factors and sympathetic activity in young men. *Hypertension* 1993; **22**: 891–899.
- 23 Diwan SK, Jaiswal N, Wanjari AK, Mahajan SN. Blood pressure response to treadmill testing among medical graduates: the right time to intervene. *Indian Heart J* 2005; **57**: 237–240.
- 24 Morise AP. Heart rate recovery. Predictor of risk today and target of therapy tomorrow? *Circulation* 2004; **110**: 2778–2780.
- 25 Vivekamamthan DP, Blackstone EH, Pothier CE, Lauer MS. Heart rate recovery after exercise is a predictor of mortality, independent of the angiographic severity of coronary disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**: 831–838.
- 26 Hespanha R. Função Respiratória. In: Hespanha R (ed) *Ergometria: Bases Fisiológicas e Metodologia Para a Prescrição de Exercício*. Rio de Janeiro: Rubio, 2004, pp 53–70.
- 27 Takamura T, Onishi K, Sugimoto T, Kurita T, Fujimoto N, Dohi K, Tanigawa T, Isaka N, Nobori T, Ito M. Patients with a hypertensive response to exercise have impaired left ventricular diastolic function. *Hypertens Res* 2008; **31**: 257–263.
- 28 Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LAS, Godoy MRP, Cação JC, Loureiro AAC, Cesarino CB, Carvalho AC, Cordeiro JAC, Burdmann B. Prevalência e fatores de risco para hipertensão em uma população urbana brasileira. *Arq Bras Cardiol* 2010; **94**: 519–526.
- 29 Duncan BB, Schmidt MI, Polanczyk CA, Homrich CS, Rosa RS, Achutti AC. Fatores de risco para doenças não transmissíveis em área metropolitana na região sul do Brasil. Prevalências e simultaneidades. *Rev Saúde Pública* 1993; **27**: 143–148.
- 30 Fuchs FD, Moreira LB, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo SC. Prevalência da hipertensão arterial sistêmica e fatores associados na região urbana de Porto Alegre. Estudo de base populacional. *Arq Bras Cardiol* 1994; **63**: 473–479.
- 31 Gillum RF. Pathophysiology of hypertension in blacks and whites. A review of the basis of racial blood pressure differences. *Hypertension* 1979; **1**: 468–475.
- 32 Klein CH, Silva NAS, Nogueira AR, Bloch KV, Campos LHS. Hipertensão arterial na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. II. Prevalência. *Cad Saúde Públ* 1995; **11**: 389–394.
- 33 Franklin SS. Hypertension in older people: part 1. *J Clin Hypertens* 2006; **8**: 444–449.
- 34 Nadruz Jr W, Coelho OR. A inter-relação da hipertensão arterial com os outros fatores de risco cardiovascular. In: Brandão A (ed). *Hipertensão*. Elsevier: Rio de Janeiro, Brazil, 2006, pp 159–167.
- 35 Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK. Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 1992; **20**: 606–611.

7.4 Anexo 4: Artigo 2 publicado no *Journal of Molecular Neuroscience* - Revisiting the M235T polymorphism position for the AGT gene and reporting a modifying variant in the Brazilian population with potential cardiac and neural impact

Revising the M235T Polymorphism Position for the AGT Gene and Reporting a Modifying Variant in the Brazilian Population with Potential Cardiac and Neural Impact

R. R. Lemos · S. G. de Lima · J. E. Gomes da Cunha ·
D. F. Oliveira · M. B. Rodrigues de Souza ·
C. F. J. Ayres · M. F. P. M. Albuquerque ·
J. R. M. Oliveira

Received: 3 October 2011 / Accepted: 1 April 2012 / Published online: 25 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract There is a growing need to curate the overwhelming amount of sequencing data which is available in many public databases. For instance, new information shows that the M235T polymorphism at the angiotensinogen gene (AGT) is actually positioned at the position corresponding to the amino acid 268 and not 235. This polymorphism is filled as rs699 in the NCBI SNP database and results in the synthesis of a threonine (T) instead of a methionine (M). It has been widely studied and associated as an important risk factor for several vascular and neuropsychiatric conditions. We faced this new situation during the targeted sequencing of 360 chromosomes from Brazilian subjects studied for the M235T polymorphism, leading to the identification of a novel variation (rs141900991). This report explores the potential impact of such a dinucleotide variation, which promotes the change of alanine (A) to serine (S) at the AGT protein structure (A237S). Considering the previous M268T variation at the four possible haplotypes combined (MA, MS, TA and TS), we performed a comparative hydrophobicity simulation, using the Kyte–Doolittle algorithm, available at the CLB Bio workbench, in the four possible haplotypes. Additional simulations were performed using the programs PolyPhen, I-Mutant and SIFT, in order to evaluate the

pathogenicity of both mutations. The predicted hydrophobicity decreases of a similar magnitude, with both MS and TA haplotypes, but the presence of both variations induces a major decrease in hydrophobicity, suggesting a cumulative effect, with possible modifying effect since that this variation per se would limit the hydrophobicity range and the latter chances in finding significant phenotype differences. A better characterization of this kind of variant is particularly important because the current genome wide scan analyses in complex disorders with cardiac or neural etiology are not generating reliable findings, especially if we consider the huge investment with such approach. Additional and unknown variations like this one, with potential modifying effect, might be more common than previously expected.

Keywords Polymorphism · AGT · Risk factors · Dinucleotide · Angiotensinogen · Haplotype

The AGT gene, mapped at the chromosome 1(1q42–q43), is expressed as angiotensinogen in the liver and cleaved by the enzyme renin and the angiotensin-converting enzyme (ACE), in order to modulate blood pressure. The M235T polymorphism at the angiotensinogen gene (AGT), filled as rs699 at the NCBI SNP database, has been widely studied and associated as an important risk factor for hypertension, and also in neuropsychiatric conditions. Some of those neuropsychiatric conditions are linked to vascular status, such as stroke, anxiety traits, bipolar disorder and sub-cortical lesions (Meira-Lima et al. 2000; Kuznetsova et al. 2004; Brenner et al. 2005; Nakase et al. 2007; van Rijn et al. 2007; Knox et al. 2010; Procopciuc et al. 2010; Watkins et al. 2010).

This polymorphism is predicted to promote the synthesis of a threonine (T) instead of a methionine (M) and a new annotation at the SNP database mentions this variant at the

R. R. Lemos, S. G. de Lima and J. E. Gomes da Cunha contributed equally to this work.

R. R. Lemos · J. E. G. da Cunha · D. F. Oliveira ·
M. B. R. de Souza · J. R. M. Oliveira (✉)
Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco,
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária,
Recife, PE CEP 50670-901, Brazil
e-mail: joao.ricardo@ufpe.br

S. G. de Lima · C. F. J. Ayres · M. F. P. M. Albuquerque
Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation,
Recife, PE, Brazil

Table 1 Hydrophobicity raw values across the 268 (former 235) and 270 positions, equivalent to the rs699 and rs141900991 variations at the four possible haplotype combinations: methionine–alanine (MA), methionine–serine (MS), threonine–alanine (TA) and threonine–serine (TS)

aa Position	WT (MA)	MS	TA	TS
259	0.0181818	0.0181818	0.0181818	0.018182
260	−0.0090909	−0.0090909	−0.0090909	−0.00909
261	−0.2545455	−0.2545455	−0.2545455	−0.25455
262	0.4090909	0.4090909	0.4090909	0.409091
263	0.418182	0.418182	0.181818	0.181818
264	−1.36E-08	−1.36E-08	−0.23636	−0.23636
265	0.227273	−0.00909	−0.00909	−0.24545
266	0.190909	−0.04545	−0.04545	−0.28182
267	0.654545	0.418182	0.418182	0.181818
*268	0.690909	0.454545	0.454545	0.218182
269	0.681818	0.445455	0.445455	0.209091
*270	0.654545	0.418182	0.418182	0.181818
271	0.772727	0.536364	0.536364	0.3
272	1.009091	0.772727	0.772727	0.536364
273	0.918182	0.681818	0.681818	0.445455
274	0.427273	0.190909	0.427273	0.190909
275	0.4	0.163636	0.4	0.163636
276	0.1181818	0.1181818	0.1181818	0.118182
277	0.5727272	0.5727272	0.5727272	0.572727
278	−0.1	−0.1	−0.1	−0.1

* Underscoring the protein sites where the mutations occur

M268T position. This is due to the fact that the new position is considering the signal peptide, from one to 33 amino acids. This new position is more meaningful when discussed with the context of the unprocessed product (with the signal peptide). However, it is important to highlight this update in order

to avoid possible misunderstanding for future studies over such widely studied SNP. We became aware of this new positional status during the targeted sequencing of 360 chromosomes from Brazilian subjects studied for the rs699 SNP.

Additionally, we identified a novel variation (rs141900991) in every control sample and affected patients with hypertension or in risk groups of subject presenting hypertension episodes after major efforts such as using a treadmill. This novel variation consists of a double mutation in two followed nucleotide sites (from AG to GT) and changes a previous serine (S) for an alanine (A). An earlier report at the literature has recently classified this same kind of mutation in a unique group, together with single and triple nucleotide variations (SNPs and TNPs, respectively), called xNPs. Unsurprisingly, the dinucleotide polymorphisms (DNPs) and TNPs have been described as having a greater probability of giving rise to a non synonymous (and probably pathogenic) variation (Rosenfeld et al. 2010).

The classification proposed by Rosenfeld and colleagues (2010) highlights DNPs and TNPs as a promising novel kind of mutation, which needs to be better understood amid the complex mutational types exhibited throughout the whole genome. An analysis of the exome of U87 glioblastoma cell line has identified several xNPs, being some of them predicted as a damaging mutation by bioinformatics programs and present in genes which are already related to the pathogeny of this neoplasia (Rosenfeld et al. 2010). Additionally, it has also been reported in the literature a DNP at the P73 gene as having a possible effect on the lung cancer susceptibility (Hu et al. 2005).

Therefore, in order to assess the potential impact of such dinucleotide variation (A237S) on the AGT protein structure, we performed a comparative hydrophobicity simulation, using a Kyte–Doolittle algorithm, available at the CLBio workbench combined [®]3.6.3 platform, considering the previous M235T variation, in four possible haplotypes at

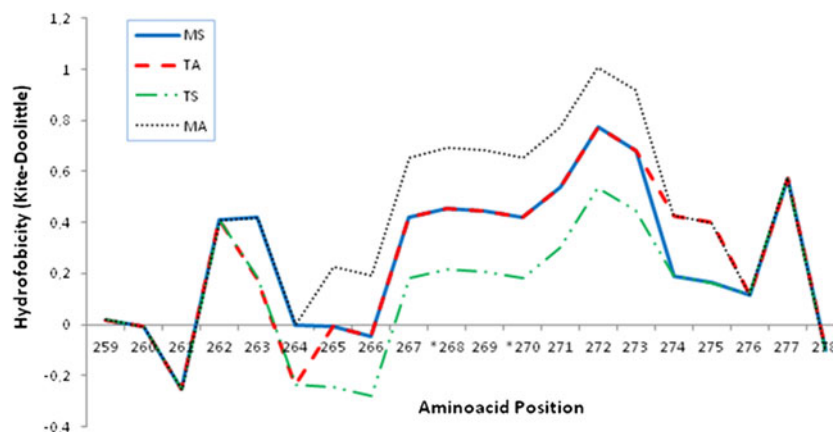


Fig. 1 Hydrophobicity variation depicted in a graphic showing portions of the AGT protein between the aminoacids 259 and 278, based on the raw data demonstrated at the table 01. The predicted hydrophobicity variation is shown across the four possible genotypes generated

by the simultaneous presence or absence of the M268T and A270S polymorphism (MA — wild phenotype; TA — sequence with only the M268T polymorphism; TS — sequence with both polymorphisms; MS — sequence with only the A270S polymorphism)

Table 2 Predicted pathogenicity status for the M268T (former M235T) and A207T predicted by Polyphen, I-Mutant and SIFT

PolyPhen (wild sequence+A270S)	Benign (PSIC 1.143)
PolyPhen (sequence with both mutations)	Pathogenic (PSIC 1.528)
PolyPhen (wild sequence+M268T)	Probably pathogenic (PSIC 1.528)
I-Mutant (wild sequence+M268T)	Decrease the stability (−0.16)
I-Mutant (wild sequence+A270S)	Decrease the stability (−0.82)
I-Mutant (sequence with both mutations)	dubious
SIFT (wild sequence+M268T)	Tolerated (1.00)
SIFT (wild sequence+A270S)	Affect protein function (0.02)
SIFT (sequence with both mutations)	Tolerated (1.00)

the now updated positions 268 and 270: methionine–alanine (MA), methionine–serine (MS), threonine–alanine (TA) and threonine–serine (TS). Curiously, the hydrophobicity decreases in a similar magnitude, with both MS or TA haplotype, but the presence of both variations induces a major decrease in hydrophobicity, suggesting a potential modifying effect since that this variation per se would limit the hydrophobicity range in a given carrier population (Table 1 and Fig. 1).

Such findings are particularly important for association and case control studies which aim to better assess the genetic risk factors for diseases such as hypertension in Brazilian population, or any other population in which this polymorphism may, eventually, be found.

We also performed an *in silico* analysis through bioinformatics programs which were designed to predict the possible pathogenic function played by the mutation of interest. The findings yielded by the programs have shown no consensus concerning to the pathogenicity of both polymorphisms (A270S and M268T) (Table 2). This might be due to either the different approaches employed by these bioinformatics tools to perform the prediction or the null effect as a damaging mutation. All the utilized programs are freely available on different websites: PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), I-Mutant (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/~emidio/I-Mutant/I-Mutant.htm>) and SIFT (<http://sift.jcvi.org/>).

However, the M268T mutation has been reported in literature as an important genetic marker for hypertension in populations all over the world. Therefore, these results bring us to conclude that both mutations still can bear an additive pathogenic function, once that the phenomenon “hypertension” is a multifactorial trait and a latter outcome of several risk factors, notwithstanding the controversial results presented by those programs.

There is a current interest in defining the possible impact in AGT haplotypes for modifying the final phenotype and to help clarifying discordant association studies (Nakajima et al. 2002).

This is very relevant since that there is a current disappointment with the enormous amount of data and analysis generated by genome-wide association studies which have turned out to be not useful or replicable.

A new hype is coming from the search for rare variants for several complex disorders which are often highly heritable, but in a very multifarious fashion, suggestive of polygenic pattern (Cousin-Frankel 2010; McClellan and King 2010).

Subsets of variations might be differently involved in specific clinical outcomes and combined haplotypes may lead to discordant results, even within the same group of disorders, such as hypertension and stroke. We believe that this kind of methodological caution is crucial for future successful association studies.

Acknowledgments This study was supported by grants from the following Brazilian funding agencies and academic bureaus: FACEPE (PPSUS-APQ-2008), CNPq, PROPESQ-UFPE, PIBIC-UFPE and CAPES. We are indebted to Dr. Hua Zhang, PhD, from the dbSNP Group (NCBI/NLM/NIH) for technical support during the course of this study. We also thank Dr. Aaron Rowe for revising the manuscript.

References

- Brenner D, Labreuche J, Poirier O, Cambien F, Amarenco P, GENIC Investigators (2005) Renin–angiotensin–aldosterone system in brain infarction and vascular death. *Ann Neurol* 58:131–138
- Cousin-Frankel J (2010) Major heart disease genes prove elusive. *Science* 328:1220–1221
- Hu Z, Miao X, Ma H et al (2005) Dinucleotide polymorphism of p73 gene is associated with a reduced risk of lung cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 10:455–460
- Knox SS, Guo X, Zhang Y, Weidner G, Williams S, Ellison RC (2010) AGT M235T genotype/anxiety interaction and gender in the HyperGEN study. *PLoS One* 5:13353
- Kuznetsova T, Staessen JA, Thijs L et al (2004) European Project On Genes in Hypertension (EPOGH) Investigators: Left ventricular mass in relation to genetic variation in angiotensin II receptors, renin system genes, and sodium excretion. *Circulation* 110:2644–2650
- McClellan J, King MC (2010) Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141:210–217
- Meira-Lima IV, Pereira AC, Mota GF, Krieger JE, Vallada H (2000) Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the risk of bipolar affective disorder in humans. *Neurosci Lett* 293:103–106

- Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T et al (2002) Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet* 70:108–123
- Nakase T, Mizuno T, Harada S et al (2007) Angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 14:943–947
- Procopciuc LM, Sitar-Tăut A, Pop D, Sitar-Tăut DA, Olteanu I, Zdrengea D (2010) Renin angiotensin system polymorphisms in patients with metabolic syndrome (MetS). *Eur J Intern Med* 21:414–418
- Rosenfeld JA, Malhotra AK, Lencz T (2010) Novel multi-nucleotide polymorphisms in human genome characterized by whole genome and exome sequencing. *Nucleic Acids Res* 38:6102–6111
- Van Rijn MJ, Bos MJ, Isaacs A et al (2007) Polymorphisms of the renin–angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:1083–1087
- Watkins WS, Hunt SC, Williams GH et al (2010) Genotype-phenotype analysis of angiotensinogen polymorphisms and essential hypertension: the importance of haplotypes. *J Hypertens* 28:65–75

7.5 Anexo 5: Artigo 3 publicado no *Frontiers in Human Neuroscience*: Mutations at the SLC20A2 gene and brain resilience in families with idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's Disease)



Mutations at the *SLC20A2* gene and brain resilience in families with idiopathic basal ganglia calcification (“Fahr’s disease”)

Danyllo F. de Oliveira¹, Roberta R. de Lemos¹ and João R. M. de Oliveira^{1,2*}

¹ Keizo Asami Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

² Neuropsychiatry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

*Correspondence: joao.ricardo@ufpe.br

Edited by:

Hauke R. Heekeren, Freie Universität Berlin, Germany

Reviewed by:

Maria-Jesus Sobrido, Fundacion Publica Galega de Medicina Xenomica, Spain

A commentary on

Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis

by Wang, C., Li, Y., Shi, L., Ren, J., Patti, M., Wang, T., et al. (2012). *Nat. Genet.* 44, 254–256. doi: 10.1038/ng.1077

Wang et al. (2012) recently identified seven novel mutations at the *SLC20A2* gene in families from China, Spain and Brazil, suggesting that Familial Idiopathic Basal Ganglia Calcification (IBGC) might be a phosphate imbalance disorder. Expressing wild-type human *SLC20A2* and the mutated variants, using transport assays in *Xenopus* oocytes, resulted in significant impaired Pi transport. On the other hand, mutants did not have an obvious effect on the Pi transport activity when co-expressed with the wild-type PiT2 protein, encoded by *SLC20A2*. This suggests that such mutations have an effect through haploinsufficiency (Wang et al., 2012).

Additional analysis showed that this gene is responsible for ~50% of the familial cases (Hsu et al., 2013; Lemos et al., 2013). More recently, two French families with IBGC were reported with mutations at the platelet derived growth factor receptor B (PDGFRB) gene, opening now a new venue for the comprehension of this phenotype as being caused by different molecular failures in mechanisms of vascular homeostasis (Nicolas et al., 2013).

Familial or sporadic IBGC, often called by the misnomer “Fahr’s Disease,” is a neuropsychiatric disorder with variable clinical outcome, including parkinsonism, psychosis, dementia and headaches. The

diagnosis criteria include bilateral calcifications, often documented with computerized tomography, in the absence of hormonal and metabolic imbalances. Such subjects are often misdiagnosed as patients with schizophrenia, Parkinson’s disease, bipolar Disorder, and Alzheimer’s disease (Manyam, 2005; Lemos et al., 2011).

Calcifications might also be detected in cerebellum, thalamus and cortex. The mode of inheritance of IBGC is mainly reported in literature as autosomal dominant, sometimes displaying anticipation, a phenomenon widely described in diseases with similar pattern of inheritance and first reported in familial IBGC by Geschwind et al. (1999).

Families affected with IBGC also show a variable clinical manifestation and a lack of full penetrance. Recent functional studies aiming to access the expression profiles of *SLC20A2* at the kidney, have reported that the expression of this gene is tightly linked to inorganic phosphate (Pi) concentration into the organism. Moreover, together with *SLC20A1*, these genes act at the Pi uptake under different conditions of pH and dietary Pi (Villa-Bellosta et al., 2009).

Calcification is an unspecific biochemical process occurring normally even under physiological conditions, through phosphate deposition and hydroxyapatite crystals formation, similar to the mineral fraction of the bones. However, disturbances in this process, which are often related to phosphate transport alterations at epithelial cells of blood vessels, lead to calcification around these tissues, jeopardizing the vessels’ elasticity and leading to

arteriosclerosis as well (Villa-Bellosta and Sorribas, 2011).

Curiously, Wang et al. (2012) and other authors also reported subjects with calcifications but no symptoms. Brain resilience for such lesions is still the most compelling challenge for the complete understanding of the pathological mechanisms of IBGC and others autosomal dominant neuropsychiatric conditions. Argylean et al. (2009) used neuroimaging techniques to assess the cerebellum-thalamocortical connectivity (CbTC) in individuals with dystonia and compared these data with that was yielded by the analysis of this same circuit in control individuals and asymptomatic carriers of mutations for dystonia. Their analysis showed reduced integrity of cerebellothalamocortical fiber tracts, in both clinically manifesting and nonmanifesting mutation carriers. In these subjects, reductions in cerebellothalamic connectivity were associated with increased motor activation responses, consistent with loss of inhibition at the cortical level. Nonmanifesting mutation carriers displayed an additional area of fiber tract disruption, distally situated along the thalamocortical segment, in tandem with a proximal cerebellar outflow abnormality. In individual gene carriers, clinical penetrance was determined by the difference in connectivity measured at these two sites.

Other approaches to investigate the lack of full penetrance in genetic traits have been based on functional studies using the one-thousand-cells nematode *Caenorhabditis elegans*. These analyses state that this phenomenon may occur due to mitigating mechanisms involving

“genetic interaction partners,” that is, genes involved in common molecular networks (Burga et al., 2011).

On this perspective, two molecular mechanisms have been described: the first one involves a high expression of homologous genes, which because of its similar coding sequence, still bears related functions, enabling them to play the role which should have been done by the damaged gene. The other mechanism involves Heat Shock Proteins, which, by folding proteins into its biologically active conformation, ends up attenuating the effects of mutations along the peptidic sequence (Burga et al., 2011).

The haploinsufficiency effect described by Wang et al. (2012) when expressing SLC20A2 mutations in *Xenopus* oocytes lead us to speculate that in asymptomatic carriers of those deleterious mutations must have an altered pattern of expression of paralog genes. This assumption would be in accordance with the first mechanism described by Burga and colleagues (2011). Functional studies in model organisms may be able to test this hypothesis.

Previous studies with clinical heterogeneity of familial IBGC shows that ~40% of the patients carrying basal ganglia calcification do not show symptoms. We reported previously that symptoms were present in only 28 patients with IBGC, from a total of 47 subjects with calcifications detected during a linkage analysis of 6 families (Oliveira et al., 2003). This suggests that the brain might have mechanisms to handle calcifications and the first symptoms outcome (resilience), however, we cannot exclude the possibility that we are still missing the precocious detection due to less sensitive clinical findings. On the other hand, it is well established that studies measuring the total volume of calcification shows far more deposits in symptomatic individuals compared to asymptomatic subjects (Manyam, 2005).

We suggest considering two levels of penetrance in IBGC: one for the calcification formations and another for the

clinical manifestation but only a proper follow-up of asymptomatic subjects with calcifications will detect the exact timing of the appearance the first symptoms and will define the limits of brain resilience to calcifications. An animal model will most likely provide this answer.

The concept of brain resilience is intrinsically associated to IBGC pathophysiology, since this is the most probable mechanism underlying the absence of clinical manifestations pathogenic SCL20A2 mutation carriers. This lack of concordance between the genetic and phenotypic statuses, gives rise to the probabilistic concept of penetrance in human genetics, that is, the likelihood of a given damaging genotype turns out to develop a clinical entity in its carriers.

As for IBGC, the concept of incomplete penetrance should be further elaborated, in order to better categorize phenotypically the individuals present in a given hereditogram. On this perspective, we propose the term “radiological penetrance.”

Imaging genetics is a promising strategy to integrate genotypic and phenotypic data and more studies—especially those focusing brain imaging in asymptomatic IBGC carriers—are necessary to properly test such hypotheses.

REFERENCES

- Argylean, M., Carbon, M., Niethammer, M., Ulug, A. M., Voss, H. U., Bressman, S. B., et al. (2009). Cerebellothalamocortical connectivity regulates Penetrance in dystonia. *J. Neurosci.* 31, 9740–9747. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2300-09.2009
- Burga, A., Casanueva, O. M., and Lehner, B. (2011). Predicting mutation outcome from early stochastic variation in genetic interaction partners. *Nature* 7376, 250–253. doi: 10.1038/nature10665
- Geschwind, D. H., Loginov, M., and Stern, J. M. (1999). Identification of a locus on chromosome 14q for idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's Disease). *Am. J. Hum. Genet.* 65, 764–772. doi: 10.1086/302558
- Hsu, S. C., Sears, R. L., Lemos, R. R., Quintáns, B., Huang, A., Spiteri, E., et al. (2013). Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic

- basal ganglia calcification. *Neurogenetics* 14, 11–22. doi: 10.1007/s10048-012-0349-2
- Lemos, R. R., Oliveira, D. F., Zatz, M., and Oliveira, J. R. M. (2011). Population and computational analysis of the P521A MGEA6 variation as a risk factor for idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's Disease). *J. Mol. Neurosci.* 43, 333–336.
- Lemos, R. R., Oliveira, M. F., and Oliveira, J. R. M. (2013). Reporting a new mutation at the SLC20A2 gene in familial idiopathic basal ganglia calcification. *Eur. J. Neurol.* 20, e43–e44. doi: 10.1111/ene.12044
- Manyam, B. (2005). What is and what is not 'Fahr's Disease.' *Parkinsonism. Relat. Disord.* 11, 73–80. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.12.001
- Nicolas, G., Pottier, C., Maltête, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Legallic, S., et al. (2013). Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* 80, 181–187. doi: 10.1212/WNL.0b013e31827ccf34
- Oliveira, J. R. M., Hopfer, S., Papp, J., Spiteri, E., Klepper, J., Gilbert, J., et al. (2003). A genome wide scan for familial idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's disease) identifies new candidate regions and confirms genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 5, 570.
- Villa-Bellosta, R., Ravera, S., Sorribas, V., Stange, G., Levi, M., Murer, H., et al. (2009). The Na-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 296, 691–699. doi: 10.1152/ajprenal.90623.2008
- Villa-Bellosta, R., and Sorribas, V. (2011). Calcium phosphate deposition with normal phosphate concentration—role of pyrophosphate. *Circ. J.* 75, 2705–2710.
- Wang, C., Li, Y., Shi, L., Ren, J., Patti, M., Wang, T., et al. (2012). Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat. Genet.* 44, 254–256. doi: 10.1038/ng.1077

Received: 12 March 2012; accepted: 12 July 2013; published online: 05 August 2013.

Citation: de Oliveira DF, de Lemos RR and de Oliveira JRM (2013) Mutations at the SLC20A2 gene and brain resilience in families with idiopathic basal ganglia calcification (“Fahr's disease”). *Front. Hum. Neurosci.* 7:420. doi: 10.3389/fnhum.2013.00420

Copyright © 2013 de Oliveira, de Lemos and de Oliveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7.6 Anexo 6: Artigo 4 publicado no ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research*** - Exaggerated blood pressure response during the exercise treadmill testing as a risk factor for hypertension

Exaggerated blood pressure response during the exercise treadmill test as a risk factor for hypertension

S.G. Lima¹, M.F.P.M. Albuquerque¹, J.R.M. Oliveira², C.F.J. Ayres³, J.E.G. Cunha², D.F. Oliveira², R.R. Lemos², M.B.R. Souza² and O. Barbosa e Silva⁴

¹Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

⁴Laboratório de Ergometria, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Abstract

Exaggerated blood pressure response (EBPR) during the exercise treadmill test (ETT) has been considered to be a risk factor for hypertension. The relationship of polymorphisms of the renin-angiotensin system gene with hypertension has not been established. Our objective was to evaluate whether EBPR during exercise is a clinical marker for hypertension. The study concerned a historical cohort of normotensive individuals. The exposed individuals were those who presented EBPR. At the end of the observation period (41.7 months = 3.5 years), the development of hypertension was analyzed within the two groups. Genetic polymorphisms and blood pressure behavior were assessed as independent variables, together with the classical risk factors for hypertension. The I/D gene polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and M235T of angiotensinogen were ruled out as risk factors for hypertension. EBPR during ETT is not an independent influence on the chances of developing hypertension. No differences were observed between the hypertensive and normotensive individuals regarding gender ($P = 0.655$), skin color ($P = 0.636$), family history of hypertension ($P = 0.225$), diabetes mellitus ($P = 0.285$), or hypertriglyceridemia ($P = 0.734$). The risk of developing hypertension increased with increasing body mass index (BMI) and advancing age. The risk factors, which independently influenced the development of hypertension, were age and BMI. EBPR did not constitute an independent risk factor for hypertension and is probably a preclinical phase in the spectrum of normotension and hypertension.

Key words: Hypertension; Risk factors; Exaggerated blood pressure response

Introduction

Owing to the importance of hypertension as a public health problem, treatment strategies should aim to combat the risk factors that influence its development, with knowledge about these factors representing a fundamental issue. Among the factors involved in the etiopathogeny of hypertension, one third are of a genetic nature (1). However, many studies may have underestimated the impact of these genes, since behavioral patterns such as obesity, excessive alcohol consumption, exercise, among other classical risk factors, can also be modulated by genetic factors (2). Several genes, which encode the renin-angiotensin system proteins, have been implicated in the etiopathogeny of hypertension, although there are conflicting results amongst studies (3).

The exaggerated blood pressure response (EBPR) during the exercise treadmill test (ETT) has also been considered to be an independent risk factor for developing hypertension (4,5). It is estimated that the probability of normotensive individuals with EBPR becoming hypertensive would be 4 or 5 times greater than that displayed by normotensives with normal blood pressure during the ETT (6). Some authors, however, do not corroborate these findings (7).

Due to the need of obtaining a better understanding of the influence of EBPR in determining hypertension, the aim of this study was to analyze the association between EBPR and hypertension, controlling the effect of the classical risk factors for hypertension and the genetic polymorphisms in the statistical analysis.

Correspondence: S.G. Lima, Rua Frei Jaboatão, 180/2802, 50710-030 Recife, PE, Brasil. E-mail: sandrolima2002@gmail.com

Received November 26, 2012. Accepted February 8, 2013. First published online April 19, 2013.

Material and Methods

We studied a retrospective cohort of normotensive subjects who performed the ETT between February 1998 and December 2008 in a private cardiology clinic located in the city of Recife, northeastern Brazil. The exposure of interest was EBPR and the outcome (event of the study) was the development of hypertension. First, individuals were identified to have EBPR [subjects with high systolic blood pressure (SBP) at rest to maximum effort ≥ 7.5 mmHg/MET (metabolic equivalents) and/or SBP at the peak of effort ≥ 220 mmHg who were defined as reactive hypertensive individuals through the systolic component (SRH) or subjects with high diastolic blood pressure (DBP) at rest to maximum effort ≥ 15 mmHg, from normal levels of blood pressure at rest who were defined as reactive hypertensive individuals through the diastolic component (DRH)]. A random sample similar in size to the exposed group was selected from those who presented normal blood pressure during exercise (not exposed). At the end of the observation period, the outcome (developing hypertension) was analyzed within the groups based on clinical records and data from ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) (Figure 1).

Patients taking antihypertensives or any other drug, which could interfere with blood pressure (BP) (amiodarone, beta blockers, levothyroxine, digoxin) during the ETT, individuals undergoing diagnostic investigation for hypertension, individuals who revealed any signs of localized pain or discomfort, any cardiac rhythm or conduction disturbances, suspicion of electrocardiographic alterations due to myocardial ischemia, breath sounds compatible with pulmonary congestion or bronchospasm, and those who did not reach submaximal heart rate during the exercise, were excluded from the study.

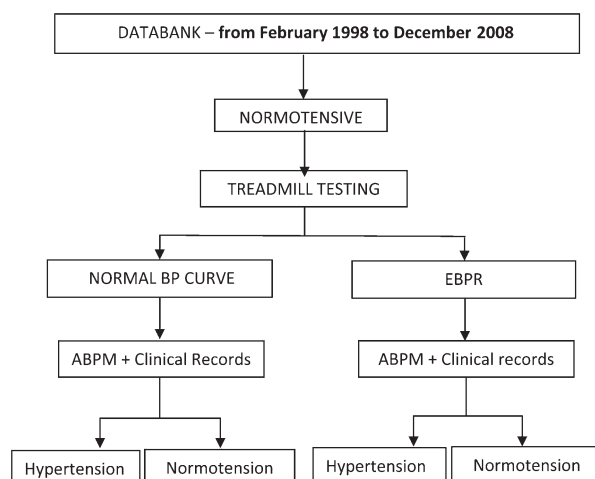


Figure 1. Study design. BP = blood pressure; EBPR = exaggerated BP response; ABPM = ambulatory BP monitoring.

Sample size was calculated with Epi-Info 2000, taking into account the following parameters: type α error = 0.05%, type β error = 20%, power of the study = 80%; RR = 3.0; assuming a case frequency (hypertension) among the non-exposed group of 8% (8), which resulted in a total of 188 patients, 94 of them in the non-exposed group and 94 in the exposed group. However, due to loss prediction, all individuals who met the established inclusion criteria were included (Figure 2).

The genetic polymorphisms, BP behavior during ETT, together with the classical risk factors for hypertension [diabetes mellitus (DM), hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypertensive individuals in the immediate family, skin color, and body mass index (BMI)] were analyzed as independent variables (predictive factors). At the time of performing ABPM and analyzing the outcomes, information related to risk factors for hypertension was collected once again from both groups in order to assess if any significant changes in prevalence had taken place during the observation period, which may have interfered with the risk of developing hypertension.

Owing to the fact that BP assessment was performed by ABPM, we employed the criteria of abnormality defined for this method (9), i.e., SBP > 130 mmHg and/or a mean DBP > 80 mmHg or self-reported hypertension and taking antihypertensives, and normotension as a mean SBP ≤ 130 mmHg and mean DBP ≤ 80 mmHg.

The polymorphism studies were conducted using the polymerase chain reaction (PCR). Primers employed for the angiotensinogen (AGT) gene were: FW - 5'-GGA AGG ACA AGA ACT GCA CCT C-3' and RV - 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3' (10) and the primers for the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene were: FW - 5'-CYG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' and RV - 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' (11). Analysis of ACE allele variation (I/I, I/D, and D/D) was performed on 1.5% agarose gel. After amplification of the genetic region of interest of the AGT

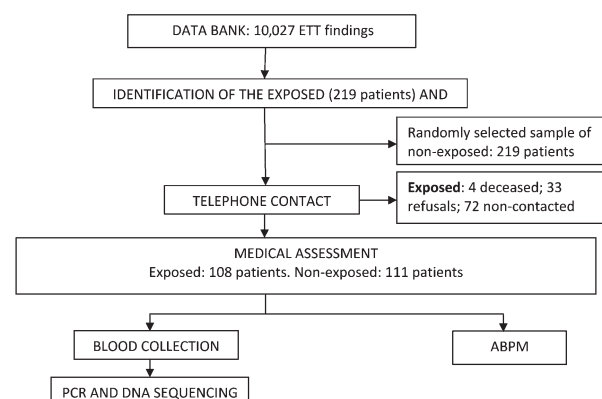


Figure 2. Flowchart of data collection. ETT = exercise treadmill test; ABPM = ambulatory blood pressure monitoring.

gene polymorphism, the PCR products were purified and sequenced with a MegaBACE 1000 system (USA).

Univariate analysis was performed to determine the existence of any association between each of the studied variables and hypertension. As the age and BMI variables showed a non-linear monotonic relationship with the probability of hypertension, the non-linear variable was transformed into a linear variable by adjusting the fractional polynomials, which indicated a quadratic relationship with age and a cubic relationship with BMI. These transformations were incorporated into the models of logistic regression, employed to evaluate the association between the explicative variables and the outcome. Age, being a non-linear variable, was subdivided into deciles in order to obtain a number of similar subjects in each category, after which an odds ratio (OR) was calculated for each category, taking the youngest individuals as reference. The BMI variable was subdivided into categories related to nutritional status.

The calculated association measure was OR in lieu of RR, since it has been employed in statistical analyses of binary outcomes in the medical literature (12) and the analysis of the effect of each independent variable on the dependent variable was controlled by the time lapse between undergoing the ETT and performing the ABPM.

In the final model, all variables, which indicated an association with an outcome of P value <0.20 in the bivariate analysis (controlled by time), were included in the model. Selection of variables for the final multivariate model was carried out with the stepwise backward model, establishing a significance level of 0.05 for the variables remaining in the model and 0.10 for the output variables. The correlation coefficients were calculated together with their respective significances, the OR estimates and their respective confidence intervals. Hardy-Weinberg equilibrium was determined using the chi-square test.

The study protocol was approved by the CPqAM - FIOCRUZ Research Ethics Committee (Registration CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 79/07 and Registration CAAE: 0079.0.095.000-07).

Results

The study population was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. The mean observation period of this cohort was 41.7 months (3.5 years). The cumulative incidence of hypertension among the hyperreactive individuals (21.6%) was significantly higher ($P = 0.009$) than that observed among the normoreactive individuals (8.7%). In this sample, the probability of a normotensive individual with EBPR during ETT developing hypertension, adjusted by the time spent in the cohort, was 2.4 times greater than that of the normoreactive individuals. The incidence density of hypertension for normoreactive and hyperreactive individuals was 2.82 and 4.76%, respectively. The proportion of SRH was found to be significantly higher amongst the individuals who developed hypertension in comparison to the DRH ($P = 0.005$; OR = 4.9 vs 1.3).

There was no difference between hypertensive and normotensive individuals regarding gender ($P = 0.655$), skin color (0.636), a family history of hypertension ($P = 0.225$), DM ($P = 0.285$), and hypertriglyceridemia ($P = 0.734$). The prevalence of DM, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in the general population was 3, 10.9 and 5.5%, respectively. The proportion of individuals with hypercholesterolemia was significantly higher in the hypertensive group ($P = 0.022$) compared to the normotensive individuals. The I/D ACE and M235T AGT polymorphisms did not constitute a risk factor for hypertension (Tables 1 and 2).

The prevalence of risk factors observed at the time of performing ABPM is presented in Table 3. When the effect of the variable "BP behavior during ETT" was controlled by the effect of the other variables (age, BMI and hypercholesterolemia) in a multivariate logistic regression model, it was found not to have an independent influence on the risk of developing hypertension ($P = 0.098$).

The risk of developing hypertension increased with age and BMI. The grade I and grade II obesity categories

Table 1. Analysis of the association between the I/D polymorphism of the ACE gene and hypertension.

	Normotensive	Hypertensive	OR (95%CI)	P*
Genotypes				
I/I	25 (83.3%)	5 (16.7%)	1.0	0.755
I/D	81 (87.1%)	12 (12.9%)	0.7 (0.24-2.31)	
D/D	65 (83.3%)	13 (16.7%)	1.0 (0.32-3.10)	
Alleles				
I	131 (85.6%)	22 (14.4%)	0.9 (0.51-1.71)	0.810
D	211 (84.7%)	38 (15.3%)	1.0	

Data are reported as the number of subjects with percent within parentheses. ACE = angiotensin-converting enzyme. *Chi-square test.

Table 2. Analysis of the association between the M235T polymorphism of the AGT gene and hypertension.

	Normotensive	Hypertensive	OR (95%CI)	P*
Genotypes				
T/T	46 (85.2%)	8 (14.8%)	1.0	0.839
T/C	83 (83.8%)	16 (16.2%)	1.1 (0.44-2.79)	
C/C	42 (87.5%)	6 (12.5%)	0.8 (0.26-2.56)	
Alleles				
T	175 (84.5%)	32 (15.5%)	0.9 (0.51-1.64)	0.757
C	167 (85.6%)	28 (14.4%)	1.0	

AGT = angiotensinogen. *Exact Fisher test.

were pooled since the latter category presented a frequency in only three individuals, therefore resulting in a very wide confidence interval. The final multivariate model (with the variables, which remained at a P value <0.05) is presented in Table 4.

Discussion

Distinguishing features in the results of the present study are the lack of association between I/D ACE and M235T AGT polymorphisms and hypertension, the high prevalence of EBPR in the studied cohort and the lack of association between EBPR and hypertension.

There is no consensus in the literature with respect to the influence of I/D ACE polymorphism on BP or as a determining factor for hypertension. Some studies have shown an association of the D allele with hypertension (3,13,14), while others have reported a complete lack of any association between the mutation and the phenotype (3,15,16). The same may be observed in relation to the association between hypertension and M235T polymorphism (13,14,17,18). Apart from variations in these

studies regarding methodological approach, location, sample size and adjustment for confounding factors, the variability in the frequency of risk factors and their associations with hypertension in different populations may be due to complex interactions between the environment and genetic factors.

The higher EBPR prevalence encountered in the present study (12.6%) may be partially justified by the more stringent criteria adopted for defining EBPR, which has meant that the denominator suffered a significant reduction. This may be confirmed by the adopted exclusion criteria, which included all conditions that could in any way either mask the EBPR, such as the use of antihypertensives, or bring about a rise in BP through mechanisms linked to the specific condition, and not as a BP response to the amount of exercise undertaken, such as chest pain and bronchospasm, among others.

When analyzing the role of EBPR in developing hypertension, Sharabi et al. (19) also reported a higher risk for SRH (OR = 7.6) than DRH (OR = 5.7). Several investigators have found an independent association between EBPR and hypertension (5,20,21). Other studies,

Table 3. Prevalence of risk factors for hypertension in normoreactive and hyperreactive individuals.

Risk factor	Normoreactive group	SRH	DRH	P
Age (years)	44.6	60.7	46.5	<0.001*
BMI (kg/m ²)	25.5	27.6	25.9	0.011*
Gender				
Male	48 (49.0%)	19 (19.4%)	31 (31.6%)	0.902 ⁺
Female	63 (52.1%)	22 (18.2%)	36 (29.8%)	
Diabetes mellitus	6 (40.0%)	7 (46.7%)	2 (13.3%)	0.013 ⁺
Dyslipidemia	36 (55.4%)	17 (26.2%)	12 (18.5%)	0.023 ⁺
Family history of hypertension	73 (51.4%)	19 (13.4%)	50 (35.2%)	0.011 ⁺
Smoking	5 (27.8%)	5 (27.8%)	8 (44.4%)	0.110 ⁺
Adding salt to food	26 (51.0%)	16 (31.4%)	9 (17.7%)	0.973 ⁺
Sedentarism	54 (49.5%)	24 (22.0%)	31 (28.4%)	0.053 ⁺
Stress	62 (51.2%)	23 (19.0%)	36 (29.8%)	0.940 ⁺

Data are reported as the number of subjects with percent within parentheses, except for age and BMI. SRH = reactive hypertension through the systolic component; DRH = reactive hypertension through the diastolic component; BMI = body mass index. *Student t-test; ⁺chi-square test.

Table 4. Multivariate analysis of the association between risk factors, which remained in the model with a P value <0.05, and hypertension.

Variable	Reference*	N	Hypertension (%)	P	Adjusted OR ⁺	95%CI
Age (years)				0.005		
18 to 27	21.5	24	12.5		1.0	-
28 to 33	30.5	20	5.0		1.2	1.03 to 1.41
34 to 37	36.0	15	0.0		1.4	1.06 to 1.83
38 to 41	40.0	18	0.0		1.6	1.08 to 2.29
42 to 44	43.0	22	27.3		1.7	1.10 to 2.74
45 to 47	46.0	19	10.5		1.9	1.12 to 3.33
48 to 52	50.0	24	20.8		2.3	1.15 to 4.40
53 to 57	53.0	21	14.3		2.5	1.18 to 5.51
58 to 63	60.5	18	22.2		3.6	1.25 to 10.23
64 to 76	70.0	20	30.0		5.9	1.37 to 25.18
BMI (kg/m ²)				<0.001		
16.0 to 18.4	17.2	7	0.0		1.0	-
18.5 to 24.9	21.7	96	10.4		1.6	1.26 to 2.07
25.0 to 29.9	27.5	80	15.0		4.2	2.01 to 8.98
30.0 to 39.9	35.0	18	44.4		32.6	5.36 to 198.06
Period of cohort (years)	-	-	-	0.008	1.2	1.0 to 1.4

BMI = body mass index. *midpoint of the class; ⁺adjusted model: logistic (probability of hypertension) = $-5.19 + 0.0141$ period of cohort + 0.0004 age² + 0.0001 BMI³. Significance of model variables: time of the cohort (P = 0.038); age² (P = 0.017); BMI³ (P < 0.001).

on the other hand, have concluded that EBPR is not a risk factor for hypertension (7). Multivariate analysis of the present data did not indicate an independent effect of EBPR as a risk factor for hypertension. Under these circumstances, and taking into account a number of other studies, which have presented a positive association, it is worth highlighting not only the importance of defining the criteria for EBPR, but also questions related to sample heterogeneity, type of ergometer, procedures employed during exercise, statistical analysis model, and even subjective variation while measuring BP.

There is no uniformity in the criteria employed by many of the studies in order to define EBPR (22). Some authors only consider the systolic component of BP to define EBPR (21,23), while others take gender into account (24). With regard to tension levels, which are used as a cutoff point to define EBPR, the heterogeneity of opinions is even greater, both for SBP and DBP (19,20). However, the majority of authors do not consider the relationship with the amount of exercise undertaken. When SBP level is divided by the number of METs, an index is established, which may indicate an EBPR for the amount of exercise (25). With regard to the DBP, on the other hand, the variation between rest and maximum effort seems much more representative of the real BP behavior than the maximum level of DBP reached, as many investigators have adopted.

Another factor, which should be taken into account, is the duration of the observation period, from undertaking the stress test until the time of ascertaining the outcome.

Although the variables have been adjusted with regard to the time of exposure (the observation period of the cohort), it is nonetheless considered that a period of approximately 4 years is still not enough for hypertension to become apparent. This may therefore justify both the low incidence of hypertension in this population and the lack of association between EBPR and hypertension.

One possible explanation for the lack of association between BP behavior during ETT and hypertension is that the effect attributed to EBPR when developing hypertension may have been counterbalanced by the modification of the risk profile of the normoreactive and hyperreactive groups after undertaking the ETT. Data concerning the risk factors collected at the time of performing the ABPM revealed that there were fewer risk factors in the hyperreactive individuals than in the normoreactive individuals. This fact may have contributed to reducing the risk within this group, despite the influence of EBPR encountered within the group.

Another explanation seems much more probable, however: it is possible that the association between EBPR and hypertension, as confirmed by the literature, qualifies EBPR not as a risk factor for hypertension, but rather as a pre-hypertensive condition (disease marker/preclinical condition). Thus, in the natural history of hypertension, departing from a condition of normotension to hypertension, there would be an intermediary stage characterized by EBPR during exercise, which occurs as a consequence of the risk factors that directly influence the onset of hypertension, such as age and BMI. In other

words, during the life history of a hypertensive individual, there would be a coming together of risk factors, which would ultimately contribute to the move from a normotensive condition with EBPR to hypertension. The hypothesis of this study can be still based on the observations of Carretero and Oparil (26), according to whom genetic susceptibility continues to be added to other risk factors and, because of this, the BP curve progressively starts shifting to the right, indicating that the individual is moving from a normotensive condition towards a hypertensive condition.

Among the classical risk factors for hypertension, only age and BMI have been shown to have an independent association with the development of hypertension. Risk increases with age, and is 3 times greater in hypertensive individuals in the age range between 64 and 76 than in normotensive individuals. Cipullo et al. (27) also reported the progressive increase of the risk with advancing age up to 69 years of age. Other studies have also reported age as a risk factor for hypertension (28).

An increased BMI has also shown a direct relation to increased risk. Risk estimates based on the Framingham Study suggest that about 75% of men and 65% of women suffer from hypertension as a direct result of being overweight (29). The INTERSALT Study indicated a correlation between BMI and both SBP and DBP regardless of age, alcohol consumption, smoking, and urinary sodium excretion (30).

It is possible that the lack of association between risk factors such as DM, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia and hypertension (28) has suffered the influence of a low incidence of hypertension in the population studied here. In Brazil, the prevalence of hypertension, as described in the literature, ranges from 24.8 to 44.4% (31,32). The prevalence of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in this sample is also found to be below the median of the prevalence in national studies (33). These prevalences may have suffered an

information bias, since information regarding cholesterol levels, triglycerides and glucose was obtained through anamnesis and not by direct blood determinations. In agreement with the results of the present study, other investigators have also found a lack of association between hypertension and gender (27,34), skin color (35,36) and a history of hypertension in the immediate family (27). The possibility of selection bias in the present study could be mitigated, since the exposed and non-exposed individuals came from the same population. The outcome was analyzed by a single observer and the same standardized methods were employed to detect it.

The main contribution of the present study is to understand EBPR not as a risk factor, but rather as an intermediary condition between normotension and hypertension. Since the structural alterations in this evolutionary phase of hypertension have been described, the development of specific healthcare strategies is necessary as a secondary prevention policy, aiming to reduce lesions and, as a consequence, the risks of EBPR sufferers. A primary prevention strategy would be to address risk factors as a form of preventing the evolution from a healthy state to the disease (from normotension to normotension with EBPR).

The risk factors, which independently influenced the development of hypertension, were age and BMI. The I/D polymorphism of ACE and the M235T of AGT revealed no association with the development of hypertension in the study population. Although univariate analysis revealed an association between EBPR and the development of hypertension, it did not constitute an independent risk factor for hypertension, and is probably a preclinical phase of the health-hypertension spectrum.

Acknowledgments

Research supported by FACEPE.

References

1. Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de la Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 2001; 38: 1204-1209, doi: 10.1161/hy1101.099479.
2. Krieger JE, Pereira AC. Genética da hipertensão arterial. In: Brandão A (Editor), *Hipertensão*. 1st edn. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p 17-24.
3. Lima SG, Hatagima A, Silva NL. Renin-angiotensin system: is it possible to identify hypertension susceptibility genes? *Arq Bras Cardiol* 2007; 89: 427-433.
4. Matthews CE, Pate RR, Jackson KL, Ward DS, Macera CA, Kohl HW, et al. Exaggerated blood pressure response to dynamic exercise and risk of future hypertension. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 29-35, doi: 10.1016/S0895-4356(97)00223-0.
5. Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I. Blood pressure response to heart rate during exercise test and risk of future hypertension. *Hypertension* 2002; 39: 761-766, doi: 10.1161/hy0302.105777.
6. Brito FS, Vilas-Boas F, Castro I, Oliveira JA, Guimarães JI, Stein R, et al. II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre teste ergométrico. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78 (Suppl 2): 1-17, doi: 10.1590/S0066-782X2002000800001.
7. Lauer MS, Levy D, Anderson KM, Plehn JF. Is there a relationship between exercise systolic blood pressure response and left ventricular mass? The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116: 203-210.
8. Allison TG, Cordeiro MA, Miller TD, Daida H, Squires RW, Gau GT. Prognostic significance of exercise-induced systemic hypertension in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1999; 83: 371-375, doi: 10.1016/S0002-9149(98)00871-6.
9. Alessi A, Brandao AA, Pierin A, Feitosa AM, Machado CA, de Moraes Forjaz CL, et al. [IV Guideline for ambulatory

- blood pressure monitoring. II Guideline for home blood pressure monitoring. IV ABPM/II HBPM]. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85 (Suppl 2): 1-18, doi: 10.1590/S0066-782X2005002100001.
10. Araújo MS, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio. *Rev Assoc Med Bras* 2005; 51: 164-169, doi: 10.1590/S0104-42302005000300018.
 11. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 375-379, doi: 10.1016/S0008-6363(98)00179-5.
 12. Kirkwood BR, Stern JAC. *Medical statistics*. 2nd edn. Malden: Blackwell Science; 2003.
 13. Ji LD, Zhang LN, Shen P, Wang P, Zhang YM, Xing WH, et al. Association of angiotensinogen gene M235T and angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphisms with essential hypertension in Han Chinese population: a meta-analysis. *J Hypertens* 2010; 28: 419-428, doi: 10.1097/HJH.0b013e32833456b9.
 14. Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol* 2005; 6: 1, (Abstract), doi: 10.1186/1471-2369-6-1
 15. Eisenmann JC, Sarzynski MA, Glenn K, Rothschild M, Heelan KA. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8: 14, doi: 10.1186/1475-2840-8-14.
 16. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 484-492, doi: 10.1161/01.ATV.20.2.484.
 17. van den Born BJ, van Montfrans GA, Uitterlinden AG, Zwinderman AH, Koopmans RP. The M235T polymorphism in the angiotensinogen gene is associated with the risk of malignant hypertension in white patients. *J Hypertens* 2007; 25: 2227-2233, doi: 10.1097/HJH.0b013e3282efb213.
 18. Niu W, Qi Y, Cen W, Cui C, Zhuoma C, Cai D, et al. Genetic polymorphisms of angiotensinogen and essential hypertension in a Tibetan population. *Hypertens Res* 2007; 30: 1129-1137, doi: 10.1291/hypres.30.1129.
 19. Sharabi Y, Ben-Cnaan R, Hanin A, Martonovitch G, Grossman E. The significance of hypertensive response to exercise as a predictor of hypertension and cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 2001; 15: 353-356, doi: 10.1038/sj.jhh.1001157.
 20. Everson SA, Kaplan GA, Goldberg DE, Salonen JT. Anticipatory blood pressure response to exercise predicts future high blood pressure in middle-aged men. *Hypertension* 1996; 27: 1059-1064, doi: 10.1161/01.HYP.27.5.1059.
 21. Farah R, Shurtz-Swirski R, Nicola M. High blood pressure response to stress ergometry could predict future hypertension. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 366-368, doi: 10.1016/j.ejim.2008.09.016.
 22. Marsaro EA, Vasquez EC, Lima EG. [Blood pressure assessment in normoreactive and hyperreactive patients. A comparative study between casual and ambulatory blood pressure monitoring]. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67: 319-324.
 23. Jae SY, Fernhall B, Heffernan KS, Kang M, Lee MK, Choi YH, et al. Exaggerated blood pressure response to exercise is associated with carotid atherosclerosis in apparently healthy men. *J Hypertens* 2006; 24: 881-887, doi: 10.1097/01.hjh.0000222758.54111.e2.
 24. Chang HJ, Chung J, Choi SY, Yoon MH, Hwang GS, Shin JH, et al. Endothelial dysfunction in patients with exaggerated blood pressure response during treadmill test. *Clin Cardiol* 2004; 27: 421-425, doi: 10.1002/clc.4960270713.
 25. Hespanha R. Função respiratória. In: Hespanha R (Editor), *Ergometria. Bases fisiológicas e metodologia para a prescrição de exercício*. 1st edn. Rio de Janeiro: Rubio; 2004. p 53-70.
 26. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101: 329-335, doi: 10.1161/01.CIR.101.3.329.
 27. Cipullo JP, Martin JF, Ciorlia LA, Godoy MR, Cacao JC, Loureiro AA, et al. [Hypertension prevalence and risk factors in a Brazilian urban population]. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94: 519-526, doi: 10.1590/S0066-782X2010005000014.
 28. Anonymous. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. São Paulo: Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2006.
 29. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J III, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study. *Prev Med* 1987; 16: 235-251, doi: 10.1016/0091-7435(87)90087-9.
 30. Dyer AR, Elliott P, Shipley M. Body mass index versus height and weight in relation to blood pressure. Findings for the 10,079 persons in the INTERSALT Study. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 589-596.
 31. Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M. Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83: 429-433, doi: 10.1590/S0066-782X2004001700009.
 32. de Souza AR, Costa A, Nakamura D, Mocheti LN, Stevanato Filho PR, Ovando LA. A study on systemic arterial hypertension in Campo Grande, MS, Brazil. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 441-446, doi: 10.1590/S0066-782X2007000400013.
 33. Bloch KV, Rodrigues CS, Fiszman R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial - uma revisão crítica da literatura brasileira. *Rev Bras Hipertens* 2006; 13: 134-143.
 34. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-223.
 35. Gillum RF. Pathophysiology of hypertension in blacks and whites. A review of the basis of racial blood pressure differences. *Hypertension* 1979; 1: 468-475, doi: 10.1161/01.HYP.1.5.468.
 36. Centers for Disease Control and Prevention (USA). Racial/ethnic disparities in prevalence, treatment, and control of hypertension - United States, 1999-2002. *Morbidity Mortality Weekly Report* 2005; 54: 7-9.