

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Genética

Carolina de Castro Andrade Jorge

**CONTRIBUIÇÃO DAS MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES
SUBTELOMÉRICAS PARA O FENÓTIPO DIFICULDADE DE APRENDIZAGEM NA
MATEMÁTICA**

Belo Horizonte
2016

Carolina de Castro Andrade Jorge

**CONTRIBUIÇÃO DAS MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES
SUBTELOMÉRICAS PARA O FENÓTIPO DIFICULDADE DE APRENDIZAGEM
NA MATEMÁTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestra em Genética

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Santos Carvalho

Belo Horizonte

2016

043

Jorge, Carolina de Castro Andrade.

Contribuição das microdeleções e microduplicações subteloméricas para o fenótipo dificuldade de aprendizagem na matemática [manuscrito] / Carolina de Castro Andrade Jorge. – 2016.

97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Santos Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Dificuldade de aprendizagem. 3. Matemática. 4. Deleção Cromossômica. 5. Duplicação Cromossômica. 6. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. I. Carvalho, Maria Raquel Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Carolina de Castro Andrade Jorge

238/2016
entrada
2º/2014
CPF:
076.571.166-41

Às quatorze horas do dia 29 de novembro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "CONTRIBUIÇÃO DAS MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES SUBTELOMÉRICAS PARA O FENÓTIPO DIFICULDADE DE APRENDIZAGEM NA MATEMÁTICA", requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Maria Raquel Santos Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	34965173015	Aprovada
Karla Simone da Siva Fernandes	Hospital Santa Casa de Belo Horizonte	095298147-41	APROVADA
Marcelo Rizzatti Luizon	UFMG	277.38.188-92	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 29 de novembro de 2016.

Maria Raquel Santos Carvalho - Orientadora

Karla Simone da Siva Fernandes

Marcelo Rizzatti Luizon

Aprovada
Paula
Fernandes
Luizon

Dedico este trabalho à minha família, meu porto.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus pela sabedoria, força, saúde, presença constante e realização do impossível em minha vida;

Ao meu esposo e filhos por serem meus maiores incentivadores, pelo amor, carinho, compreensão e paciência dedicados a mim. Pela base sólida que temos como família e pelas alegrias diárias.

Aos meus pais e irmãos por todo apoio e incentivo. Em especial a minha mãe por me substituir como mãe e dona de casa nos momentos mais difíceis e por todo amor dispensado a minha família.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho pela oportunidade de realizar o mestrado no Laboratório de Genética Humana e Médica, pelo crescimento profissional, pessoal e por sua orientação;

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana e Médica pela grata amizade, experiências trocadas e pelo apoio. Em especial a Gabriela Salazar, Aline Martins, Izinara Rosse, Marlene Miranda, Fernanda Santos e Pablo Fonseca por toda ajuda, ensinamentos, carinho e incentivo.

Ao Dr. Vitor Haase, Giulia Paiva, Amanda Oliveira e Annelise Júlio-Costa do laboratório de Neuropsicologia do desenvolvimento pelo apoio, coleta de material biológico, realização dos testes para triagem e diagnóstico neuropsicológico e por todo ensinamento;

À Dra. Karla Fernandes por ter me dado à oportunidade de iniciar no mundo científico pela receptividade em seu laboratório e por aceitar gentilmente meu convite para ser membro da banca avaliadora.

Aos colegas Fernando Rubatino e Mariana Lacerda do Instituto de ensino e pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte pelo apoio, aprendizado com a técnica de HRM e pela disposição em ajudar;

À profª Drª Fernanda Jehee pela colaboração e receptividade em seu laboratório;

Ao prof. Dr. Eduardo Tarazon pela disponibilidade dos dados de frequência alélica do projeto EPIGEN;

Aos pacientes e seus familiares pela participação neste estudo;

As minhas amigas Carolina Guilen e Fernanda Campos pelo companheirismo, momentos de descontração e principalmente pelas orações;

À todos os professores que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional;

E ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A dificuldade de aprendizagem na Matemática (DAM) se caracteriza por desempenho em Matemática anormalmente baixo para a idade e escolaridade, podendo ser temporária ou persistente, que afeta 1 a 14% das crianças em idade escolar. Os impactos do fracasso escolar na Matemática podem influenciar negativamente o contexto familiar, profissional, social, emocional e intelectual do indivíduo. A DAM pode ser causada por fatores ambientais, como baixo nível sócio-econômico, carência nutricional, ensino inadequado, falta de motivação, desinteresse, teratógenos, entre outros. Além disto, foi sugerida etiologia genética, multifatorial. Evidência de heterogeneidade vem da presença da DAM como parte do fenótipo de doenças genéticas, como Síndrome de Velocardiofacial, Síndrome de Turner, Síndrome do X frágil, Síndrome de Williams-Beuren, entre outras. A presença da DAM em síndromes genéticas sugere que alterações em *loci* gênicos específicos desencadeiam este fenótipo. Há poucos estudos investigando as bases genéticas da DAM na literatura, nenhum investigando a contribuição de microdeleções/microduplicações subteloméricas. Este é um estudo de base populacional, com o objetivo de averiguar a associação de microdeleções/microduplicações subteloméricas em crianças de idade escolar com DAM. A pesquisa foi previamente aprovada pela COEP/UFMG. A amostra foi composta por 140 casos de DAM ou dificuldade de aprendizado na Matemática e escrita (DAME). A presença de microdeleções/microduplicações subteloméricas foi investigada com o *kit* SALSA MLPA P070. Três amostras, cujos resultados foram alterados com este *kit*, foram também testadas com o *kit* SALSA MLPA P036 e por SYBR Green PCR-HRM. Entre os 140 casos investigados, foi detectada uma microdeleção de *VAMP7* na PAR2 (Xq28/Yq12); uma duplicação em *S100B* (21q22.3); e, uma duplicação em *SECTM1* (17q25.3). As duplicações dos genes *S100B* e *SECTM1* não foram confirmadas com o *kit* SALSA MLPA P036, pois este *kit* não apresenta sondas nestes genes. Entretanto, ambas foram confirmadas por SYBR Green PCR-HRM. A deleção no *VAMP7* foi confirmada tanto pelo *kit* SALSA MLPA P036, quanto por SYBR Green PCR-HRM. A frequência de CNVs nos genes *VAMP7*, *S100B* e *SECTM1* na população em geral foi avaliada em uma amostra de indivíduos normais de Belo Horizonte por SYBR Green PCR-HRM. Nenhum apresentou variação no número de cópias, embora um resultado duvidoso tenha sido encontrado para cada gene. Estes precisam ser repetidos. Antemão, podemos prever que a frequência de CNVs em *VAMP7*, *S100B* e *SECTM1* é menor do que 1% na população de Belo Horizonte. A busca em bases de dados de CNVs (DGV e DECIPHER) sugere que os três genes podem estar deletados/duplicados tanto em indivíduos normais como em indivíduos afetados. *VAMP7*, *S100B* e *SECTM1* estão relacionados a alterações no sistema nervoso e, por conseguinte podem ser considerados candidatos a déficits cognitivos. *S100B* já havia sido previamente associado à dislexia. Os resultados relatados aqui sugerem que microdeleções/microduplicações subteloméricas podem ser parte do componente genético da etiologia da dificuldade de aprendizagem da Matemática.

Palavras-chave: genética, dificuldade de aprendizagem, dificuldade de aprendizagem na Matemática, microdeleção subtelomérica, microduplicação subtelomérica, MLPA, SECTM1, VAMP7, S100B

ABSTRACT

Mathematics learning difficulty (MLD) is characterized by abnormally low Mathematical performance for age and schooling, which may be temporary or persistent, affecting 1 to 14% of school-age children. The impacts of school failure in Mathematics can negatively influence the individual's family, professional, social, emotional and intellectual context. MLD can be caused by environmental factors, such as low socioeconomic level, nutritional deficiency, elementary education, lack of motivation, lack of interest, teratogens, among others. In addition, a genetic, multifactorial etiology was suggested. Evidence for heterogeneity comes from the presence of MLD as part of genetic diseases, such as Velocardiofacial Facial Syndrome, Turner Syndrome, Fragile X Syndrome, Williams-Beuren Syndrome, among others. The presence of MLD in genetic syndromes suggests that changes in specific gene loci trigger this phenotype. There are few studies investigating the genetic bases of MLD in the literature, none investigating the contribution of subtelomeric microdeletions/microduplications. This is a population-based study, aiming at the investigation of the association of subtelomeric microdeletions/microduplications and MLD in school children. The research was approved by COEP/UFMG. The sample consisted of 140 children with MLD, being Math learning difficulty (DAM) or Math and writing learning difficulties. The presence of subtelomeric microdeletions/microduplications was investigated with the SALSA MLPA P070 kit. Three samples, the results of which were altered with this kit, also tested with the SALSA MLPA P036 kit and by SYBR Green PCR-HRM. Among the 140 cases investigated, a microdeletion of *VAMP7* was detected in PAR2 (Xq28/Yq12); a duplication in *S100B* (21q22.3); and, a duplication in *SECTM1* (17q25.3). Duplications of the *S100B* and *SECTM1* genes were not confirmed with the SALSA MLPA P036 kit, because this kit does not present probes in these genes. However, they were confirmed by SYBR Green PCR-HRM. Deletion in *VAMP7* was confirmed by both the SALSA MLPA P036 kit and by SYBR Green PCR-HRM. The frequency of CNVs in the *VAMP7*, *S100B* and *SECTM1* genes in the general population was evaluated in a sample of normal individuals from Belo Horizonte by SYBR Green PCR-HRM. None showed a variation in the number of copies, despite three doubtful results (one per gene). These will be repeated. In advance, we can predict that a frequency of CNVs in *VAMP7*, *S100B* and *SECTM1* is lower than 1% in the Belo Horizonte population. The search in CNV databases (DGV and DECIPHER) suggests that all three genes can be deleted/duplicated in both normal and affected individuals. *VAMP7*, *S100B* and *SECTM1* are related to nervous system alterations and therefore can be considered candidates for cognitive deficits. *S100B* has been previously associated with dyslexia. The results reported here suggest that subtelomeric microdeletions/microduplications may be part of the genetic component of the etiology of the Mathematics learning difficulty.

Key words: learning difficulties, Mathematics learning difficulties, subtelomeric microdeletion, subtelomeric microduplication, MLPA, SECTM1, VAMP7, S100B

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo neurocognitivo do código triplo	18
Figura 2: Configuração das atividades matemáticas no cérebro de indivíduos entre 8 a 19 anos de idade	19
Figura 3: Organização da região subtelomérica nos cromossomas	29
Figura 4: Constituição dos oligonucleotídeos A e B das sondas de MLPA	31
Figura 5: Hibridização e ligação dos oligonucleotídeos pela enzima DNA-ligase dependente de temperatura	31
Figura 6: Disposição da sonda de MLPA em um único fragmento resultante da ligação intermediada pela enzima ligase depende de temperatura	32
Figura 7: Resultado da amplificação de diferentes produtos de ligação, através de PCR, com a utilização de iniciadores universais	32
Figura 9: Deleção da sonda VAMP7 detectada pelos kits SALSA MLPA P070 e SALSA MLPA P036 na amostra 3926	46
Figura 10: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene <i>VAMP7</i>	47
Figura 11: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene <i>VAMP7</i> no cromossoma X	49
Figura 12: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene <i>VAMP7</i> no cromossoma Y	50
Figura 13: CNVs do cromossoma X que englobam o gene <i>VAMP7</i> descritas no banco de dados DGV	52
Figura 14: Duplicação da sonda S100B detectada pelo kit SALSA MLPA P070	54
Figura 15: Posição das sondas dos kits MLPA SALSA P070 e MLPA SALSA P036 na região 21q22.3	54
Figura 16: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene <i>S100B</i>	55
Figura 17: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene <i>S100B</i> no cromossoma 21	57
Figura 18: CNVs descritas no banco de dados DGV que abrangem o gene <i>S100B</i> e não incluem o gene <i>PRMT2</i>	59
Figura 19: Duplicação da sonda SECTM1 detectada pelo kit SALSA MLPA P070	61

Figura 20: Posição das sondas dos kits MLPA SALSA P070 e MLPA SALSA P036 na região 17q25.3	61
Figura 21: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene <i>SECTM1</i>	62
Figura 22: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene <i>SECTM1</i> no cromossoma 17	64
Figura 23: CNVs descritas no banco de dados DGV que abrangem o gene <i>SECTM1</i> e não a região do gene <i>TBCD</i> rastreada pela sonda do kit SALSA MLPA P036	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Instrumentos da avaliação neuropsicológica	38
Tabela 2: Sequência de iniciadores desenhados para a reação de SYBR Green PCR-HRM	42
Tabela 3: Alterações gênicas detectadas utilizando o kit de MLPA P070	45
Tabela 4: Resultado da associação de regiões adjacentes ao VAMP7 no cromossoma X e Y a fenótipos neurocognitivos	53
Tabela 5: Resultado da associação de regiões adjacentes ao gene <i>S100B</i> a fenótipos neurológicos	60
Tabela 6: Resultado da associação de regiões adjacentes ao gene <i>SECTM1</i> a fenótipos neurológicos	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCGH	Microarray-based Comparative Genomic Hybridization
ARID1B	At-rich interaction domain 1b
BLAST	Basic local alignment search tool
CBCL	Child behaviour checklist
CNVs	Copy number variations
COEP	Comitê de ética em pesquisa
COMT	Catechol-o-methyltransferase
DAM	Dificuldade de aprendizagem da Matemática
DAME	Dificuldade de aprendizagem da Matemática e escrita
DAT	Dopamine transporter
DI	Deficiência intelectual
DLD	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
DNAH5	Dynein axonemal heavy chain 5
DZ	Dizigótico
EDTA	Etilenodiamino tetra ácido
FAM43A	Family with sequence similarity 43, member A
FMR1	Fragile X mental retardation 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRIK1	Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1
GUCY1A2	Guanylate Cyclase1 soluble subnit alpha 2
GWAS	Genome-wide association study
HRM	High Resolution Melting
Kb	Kilobase
LSG1	Large subunit gtpase 1
MAQ	Mathematical anxiety questionnaire
Mb	Megabase
MLD	Mathematic learning disability
MLPA	Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification
MMP7	Matrix metallopeptidase
MYO18B	Myosin XVIII B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule

NUAK1	NUAK family Kinase 1
OD	Ordem direta
OI	Ordem inversa
P	Percentil
PAR1	Região pseudoautossômica 1
PAR2	Região pseudoautossômica 2
PAR3	Região pseudoautossômica 3
Pb	Pares de base
PCDH11X	Protocadherin 11 X-Linked
PMc	Peaks of the melting curve
PRMT2	Protein Arginine Methyltransferase 2
QAL	Escala de ansiedade de leitura
S100B	S100 calcium binding protein b
SAMD3	Sterile alpha motif domain containing 3
SECTM1	Secreted and Transmembrane 1
SIP	Sulco intraparietal
SNAP-IV	Swanson, Nolan e Pelham-IV
SNARE	SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) receptor
TBCD	Tubulin folding cofactor d
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDE	Teste de desempenho escolar
VAMP7	Vesicle associated membrane protein 7
Vs.	Versus
λ	Lambda
SNP	Single nucleotide polymorphisms
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TDE	Teste de desempenho escolar
Tm	Melting temperature
Z	Escore Z
WISC ® -IV	Wechsler Intelligence Scale for Children Fourth Edition

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Desenvolvimento De habilidades matemáticas	17
1.1.1 Representação numérica no cérebro	17
1.2 Dificuldade de Aprendizagem da Matemática	19
1.3 Manifestações fenotípicas da DAM	20
1.4 Etiologia da DAM	21
1.4.1 Fatores ambientais	21
1.4.2 Fatores neurológicos	22
1.4.3 Fatores genéticos	23
1.5 DAM e Síndromes Genéticas	27
1.6 Regiões subteloméricas	28
1.7 Justificativa e relevância	33
1.8. Objetivos	34
1.8.1 Objetivo geral	34
1.8.2 Objetivos específicos	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Aspectos éticos	35
2.2 Amostra	35
2.2.1 Amostras de base populacional	35
2.2.2 Amostra Ambulatorial	36
2.2.3 Classificação dos indivíduos	36
2.3 Avaliação neuropsicológica	37
2.4 Coleta de dados e material biológico	39
2.5 Métodos moleculares	39
2.5.1 Extração de DNA	39
2.5.2 Genotipagem	39
2.6 Análise bioinformacional	43
3 RESULTADOS	45
3.1 Resultados moleculares e bioinformacionais	45
3.1.1 Deleção VAMP7	45
3.1.2 Duplicação S100B	54
3.1.3 Duplicação SECTM1	61

3.2 Análise Neuropsicológica.....	68
3.2.1 Deleção VAMP7.....	68
3.2.2 Duplicação S100B.....	69
3.2.3 Duplicação SECTM1.....	70
4 DISCUSSÃO.....	72
4.1 Deleção VAMP7.....	73
4.2 Duplicação S100B.....	75
4.3 Duplicação SECTM1.....	78
5 PERSPECTIVAS.....	80
6 CONCLUSÃO.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento De habilidades matemáticas

Dois sistemas centrais distintos de representações numéricas são inatos e estão presentes em recém-nascidos da espécie humana, fetos no último semestre de gestação e em outras espécies de animais como macacos, aves e até mesmo abelhas (NIEDER, A., 2013; NIEDER, ANDREAS; FREEDMAN; MILLER, 2002; SCHLEGER et al., 2014).

Estes dois sistemas inatos são constituídos pela capacidade de discriminar pequenas quantidades sem contar (*subitizing*) e pela capacidade de perceber diferenças entre conjuntos maiores sem contar (senso numérico) (DEHAENE, 1997)

Habilidades numéricas precursoras servem como base para o desenvolvimento de conceitos numéricos mais sofisticados e aculturados como: aquisição de símbolos para as quantidades (palavras e números) durante a pré-escola, aprendizagem de símbolos árabes na escola primária e o desenvolvimento de uma linha numérica mental madura (VON ASTER; SHALEV, 2007).

1.1.1 Representação numérica no cérebro

Com o objetivo de investigar as habilidades matemáticas no cérebro Dehaene e colaboradores (1992;1997) propuseram um modelo neurocognitivo representando as habilidades numéricas em adultos. De acordo com este modelo, denominado “Código triplo”, existem três redes interligadas de representação mental numérica: (I) uma representação de magnitude analógica não-simbólica (ex.: ●●●) que se desenvolve no lobo parietal; (II) uma representação numérica verbal-fonológica (ex.: três), na área perisilviana esquerda; e, (III) uma representação numérica visual-arábica (ex.: 3), nas áreas associadas com a via visual ventral (Figura 1).

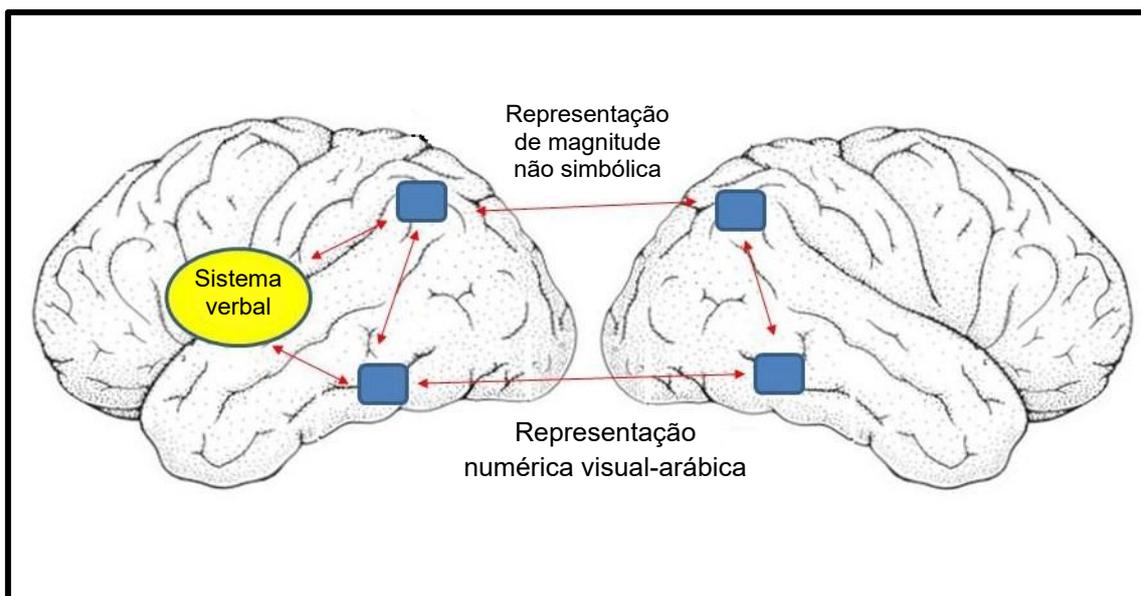


Figura 1: Modelo neurocognitivo do código triplo

Nota: Os quadrados na parte superior caracterizam a representação de magnitude não simbólica nos lóbulos parietais. Já os quadrados na parte inferior indicam a representação numérica visual-arábica nas áreas associadas à via visual ventral. O círculo configura a representação numérica verbal-fonológica na área perisilviana esquerda (Figura adaptada de Dehaene, 1997).

Dentro desta rede, o sulco intraparietal (SIP) de ambos os hemisférios é considerado o núcleo central do processamento numérico. O SIP é ativado sempre que magnitudes numéricas estão implicadas, suportando assim, a representação da magnitude de números simbólicos (DEHAENE et al., 2003).

Além dos processos cognitivos numéricos, fatores cognitivos gerais como a atenção, memória de trabalho, linguagem, função sensório-motora e habilidades visuoespaciais são importantes na realização de tarefas aritméticas. O desenvolvimento e maturação desses domínios cognitivos têm elevada importância no planejamento, escolha de estratégia e manipulação de informações. Sendo assim, diferentes regiões do cérebro responsáveis por processos cognitivos gerais, também podem fazer parte da rede neuronal do cálculo (CHRISTOFF; GABRIELI, 2000).

Em crianças o sistema cognitivo ainda é imaturo e a diferenciação funcional de domínios específicos no cérebro não está totalmente concluída (KARMILOFF-SMITH, 1998; KAUFMANN; KUCIAN; VON ASTER, 2014). Durante o desenvolvimento, a configuração de atividades relacionadas à matemática no cérebro se desloca no sentido anteroposterior. Na infância, os processos numéricos e tarefas aritméticas são

realizados nas áreas frontais (associadas com as funções executivas e memória de trabalho) e regiões temporais mediais (relacionadas com a memória declarativa), seguindo com o passar do tempo para regiões parietais (associadas com o processamento da magnitude e recuperação de fatos aritméticos) e áreas occipitotemporais (relacionadas com processamento simbólico) (ANSARI, 2008).

Essas mudanças refletem a redução da dependência de mecanismos de domínio geral (frontal) e o aumento da especialização funcional de regiões cerebrais relevantes e específicas para o processamento numérico (KAUFMANN et al., 2014). A existência dessas regiões especializadas permite ao cérebro processar os números de forma mais eficiente e automática, facilitando a realização de cálculos matemáticos mais complexos (Figura 2) (BUTTERWORTH, BRIAN; VARMA; LAURILLARD, 2011).

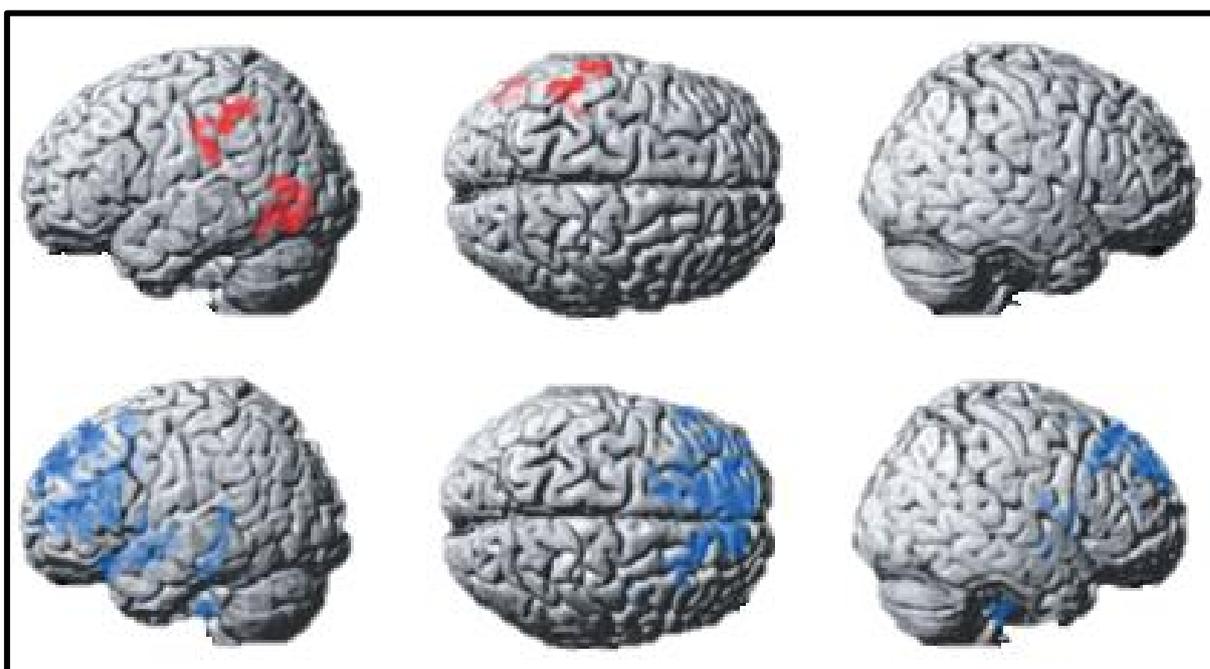


Figura 2: Configuração das atividades matemáticas no cérebro de indivíduos entre 8 a 19 anos de idade

Nota: Regiões em vermelho indicam áreas que aumentam sua atividade durante o cálculo em função da idade. Regiões em azul indicam as áreas em que a ativação durante o cálculo diminui com a idade
Fonte: adaptada de Ansari, 2008.

1.2 Dificuldade de Aprendizagem da Matemática

A dificuldade de aprendizagem da Matemática (DAM) é caracterizada por uma dificuldade temporária ou persistente, onde o indivíduo apresenta um desempenho

em matemática abaixo da média esperada para a idade (DSM-V, APA, 2014). A prevalência da DAM varia entre 1 a 14% entre crianças em idade escolar (ARCHIBALD et al., 2013; BUTTERWORTH, BRIAN; KOVAS, 2013; GEARY, 2010; LEWIS; HITCH; WALKER, 1994; MARGARI et al., 2013; SHALEV et al., 1998).

A DAM também é classificada como um transtorno cognitivo que afeta a capacidade de um indivíduo em adquirir habilidades aritméticas (BUTTERWORTH, BRIAN, 2005). Pessoas com DAM podem ter dificuldades em contar, aprender fatos numéricos, fazer cálculos, medir, mensurar tempo, se orientar e/ou estimar quantidades (SHALEV; GROSS-TSUR, 2001). Sendo assim, o portador da DAM pode ter dificuldades em tarefas básicas do dia-a-dia, tais como: orientação direita e esquerda, dificuldade em olhar horas, pegar ônibus e contar dinheiro, tornando os indivíduos afetados menos produtivos. Consequentemente, a DAM conduz a baixos salários, além de ser um fator de risco para sintomas psiquiátricos como depressão, ansiedade e comportamento agressivo (BUTTERWORTH, B., 2010; KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015; PEARD, 2010).

1.3 Manifestações fenotípicas da DAM

As manifestações fenotípicas da DAM são heterogêneas e estão relacionadas com a idade, grau de escolaridade (SHALEV; GROSS-TSUR, 2001), e funções cognitivas prejudicadas (HAASE et al., 2012; KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015). Crianças com DAM podem apresentar problemas em domínios cognitivos específicos da compreensão numérica, o que afeta a compreensão do conceito de numerosidade, a habilidade de contar, transcodificar números, aprender e resgatar fatos aritméticos e a realização das quatro operações (adição, subtração, multiplicação e divisão) (BUTTERWORTH, BRIAN, 2005; COHEN KADOSH; WALSH, 2007). Além disso, podem apresentar déficits em fatores cognitivos gerais como: memória de trabalho, linguagem, habilidades espaciais ou atenção (HAASE et al., 2012; KAUFMANN et al., 2014; VERDINE et al., 2014). Portanto, vários fatores podem interferir na manutenção das conexões cerebrais, levando a diferentes manifestações clínicas. Diante disso, o diagnóstico da DAM deve ser baseado em diferentes avaliações dos processos

numéricos, aritméticos e avaliações das habilidades de domínio geral relevantes (KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015).

Indivíduos com DAM frequentemente apresentam outros transtornos (RUBINSTEN; HENIK, 2009), principalmente, transtorno de aprendizagem da leitura (dislexia) e transtorno do déficit de atenção por hiperatividade (TDAH) (DIRKS et al., 2008; GROSS-TSUR; MANOR; SHALEV, 1996). Uma explicação para essas comorbidades é a sobreposição de redes cerebrais envolvidas em tais condições (WILSON; DEHAENE, 2007).

1.4 Etiologia da DAM

Além da heterogeneidade fenotípica, a DAM se caracteriza pela heterogeneidade etiológica (HAASE et al., 2012). Entre os possíveis fatores que contribuem para a DAM, variáveis sociais, emocionais, econômicas e culturais provavelmente são as mais relevantes (MAZZOCCO, M. M.; MYERS, 2003; MAZZOCCO, MICHÈLE MM; THOMPSON, 2005). No entanto, a predisposição genética e alterações neurodesenvolvimentais também podem contribuir para o aparecimento da DAM (SHALEV; GROSS-TSUR, 2001). Diante desta etiologia diversificada, vários estudos propõem um modelo de herança multifatorial para a DAM incluindo Miranda e colaboradores (ALARCÓN et al., 1997; BADIAN; GHUBLIKIAN, 1983; BUTTERWORTH, BRIAN, 2005; GROSS-TSUR et al., 1996; KOVAS et al., 2007; RUBINSTEN; HENIK, 2009; SHALEV et al., 2000); MIRANDA, 2011)

1.4.1 Fatores ambientais

Aspectos ambientais podem comprometer a aquisição de habilidades matemáticas. Falta de recursos econômicos, carência nutricional, ensino inadequado, relacionamento conturbado com o professor, falta de motivação e desinteresse em aprender está entre as principais causas de DAM (KOPERA-FRYE; DEHAENE; STREISSGUTH, 1996; MILLER, S. P.; MERCER, 1997).

A exposição a agentes teratogênicos também foi associada à DAM. Exposição ao álcool durante a gravidez pode provocar alterações neurodesenvolvimentais que comprometem as habilidades matemáticas (KODITUWAKKU, 2010; KOPERA-FRYE et al., 1996). O consumo de cigarro, maconha e uso excessivo de álcool na adolescência foi associado a abandono escolar, baixa escolaridade, menor frequência universitária e notas mais baixas, principalmente em Inglês, Ciência e Matemática (HOLLAR; MOORE, 2004). Consumir álcool durante a adolescência pode afetar negativamente a aprendizagem verbal e memória. A aquisição de novas informações verbais pode ser afetada, em indivíduos que bebem mais de dez doses por ocasião (NGUYEN-LOUIE et al., 2016).

Além disso, fatores comportamentais e emocionais como, por exemplo, a incapacidade de controlar a ansiedade, também tem se mostrado relevante ao processo de aprendizagem (AUERBACH; KERTZ; GARDINER, 2012; BYNNER; PARSONS, 2006; MILLER, S. P.; MERCER, 1997; PARSONS; BYNNER, 1997)

A incapacidade de administrar a ansiedade atrapalha o processo de aprendizagem produzindo um efeito negativo no desempenho das tarefas associadas à memória de trabalho. A ansiedade ocupa a memória com pensamentos intrusivos de preocupação, impedindo que o indivíduo use todo seu potencial na aprendizagem (PASSOLUNGHI et al., 2016). Vários estudos têm demonstrado, que a ansiedade matemática está relacionada à piores medidas de desempenho na Matemática (DOWKER; BENNETT; SMITH, 2012; HAASE et al., 2012; HEMBREE, 1990; SHI; LIU, 2016)

1.4.2 Fatores neurológicos

Alterações do desenvolvimento psicomotor, presente em indivíduos com DAM, podem ser explicadas por ativação cerebral anormal, irregularidades macro- e microestruturais nas áreas parietais e outras áreas fundamentais para o processamento numérico (BERTELETTI; PRADO; BOOTH, 2014; KAUFMANN; PIXNER; GÖBEL, 2011; KUCIAN, K. et al., 2006; KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015; ROTZER et al., 2008; RYKHLEVSKAIA et al., 2009)

Em estudos de neuroimagem, foi sendo descrita redução de ativação cerebral em regiões parietais, lobo frontal e áreas occipitais em indivíduos com DAM. Kucian e colaboradores (2006) em um estudo de redes neurais mostraram que crianças com DAM apresentavam uma ativação cerebral mais fraca em quase toda a rede neuronal para cálculo aproximado, incluindo o SIP e giro frontal. Outros estudos mais recentes têm corroborado estes resultados (BERTELETTI et al., 2014; KAUFMANN et al., 2011)

Além das funções cerebrais anormais, diferenças morfológicas no cérebro de crianças com DAM também já foram relatadas. Quanto às diferenças macroestruturais, a DAM foi caracterizada por redução do volume de substância cinzenta e branca em áreas fundamentais para o desenvolvimento da numerosidade (áreas parietais, SIP) (ISAACS et al., 2001; KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015; ROTZER et al., 2008; RYKHLEVSKAIA et al., 2009). Reduções no volume de substância cinzenta e branca também foram encontradas em regiões importantes para o desenvolvimento de habilidades relacionadas aos domínios cognitivos gerais (córtex frontal e áreas subcorticais) (ROTZER et al., 2008; RYKHLEVSKAIA et al., 2009).

Diferenças microestruturais relacionadas com a DAM estão associadas a anormalidades nas conexões de fibra nervosas entre as regiões cerebrais. Déficit na conexão entre as áreas parietais com as áreas frontal e occipitotemporal também tem sido observado em crianças com DAM (KUCIAN, KARIN; VON ASTER, 2015; RYKHLEVSKAIA et al., 2009)

1.4.3 Fatores genéticos

Estudos com gêmeos e famílias sugerem a existência de um componente genético para a DAM. A investigação da DAM em gêmeos monozigóticos (MZ), que compartilham ou não o mesmo ambiente, tem permitido a análise de aspectos genéticos e ambientais em indivíduos geneticamente quase iguais. Por outro lado, estudos com gêmeos dizigóticos (DZ) também tem contribuído para elucidação da concordância de distúrbios entre indivíduo que compartilham metade do genoma (RUBINSTEN; HENIK, 2009; WILLCUTT et al., 2010). Um estudo realizado com gêmeos revelou que a taxa de concordância fenotípica entre gêmeos MZ é maior

(0,73) do que para DZ (0,56), reforçando assim a influência de fatores genéticos no desenvolvimento da DAM (ALARCÓN et al., 1997).

A influência genética no processo de aprendizagem da Matemática também tem sido sugerida por estudos de agregação familiar. Estudos com famílias permitem a análise de compartilhamento de genes e de fatores ambientais, entre membros geneticamente relacionados. Um importante parâmetro para estimar a segregação familiar é o risco relativo, lambda (λ). Este parâmetro compara a frequência de afetados nas famílias com a frequência do fenótipo na população em geral, para um determinado grau ou tipo de parentesco. Quanto maior for o valor de λ , maior agregação familiar (BURTON; TOBIN; HOPPER, 2005). A prevalência de DAM entre irmãos tem sido estimada entre 40 a 64% na população. Além disso, a frequência de afetados nas famílias dos probandos tem sido estimada em 5 a 10 vezes maior do que na população geral, reforçando dessa forma a existência de um componente genético para a DAM (SHALEV; GROSS-TSUR, 2001).

O interesse em compreender as bases genéticas da DAM tem aumentado nos últimos anos e alguns estudos moleculares já foram realizados (BARON-COHEN et al., 2014; DOCHERTY et al., 2010; LUDWIG et al., 2013; SHALEV; GROSS-TSUR, 2001).

O polimorfismos da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) tem sido relacionado a memória de trabalho e a desempenho em tarefas matemáticas (DICKINSON; ELVEVAG, 2009; MIER; KIRSCH; MEYER-LINDENBERG, 2010).

A enzima COMT, no cérebro, é capaz de modular as funções de neurotransmissão da dopamina e norepinefrina, alterando a inativação metabólica destes neurotransmissores (ZHU, 2002). No córtex pré-frontal, a COMT pode degradar mais de 60% da dopamina presente nas fendas sinápticas (KAROUM; CHRAPUSTA; EGAN, 1994). O mecanismo mais eficiente para degradar a dopamina liberada no espaço extracelular é o transporte da dopamina através de proteínas DAT (*dopamine transporter*). No entanto, o córtex pré-frontal expressa baixos níveis de DAT. Com isso, essa região do cérebro depende de um mecanismo secundário, a COMT, para degradar a dopamina liberada (DAUVILLIERS; TAFTI; LANDOLT, 2015). Uma

substituição nucleotídica de G para A no códon 158 da enzima COMT (val158met) pode modificar um de seus aminoácidos produzindo uma variação polimórfica funcional (WEINSHILBOUM; OTTERNESS; SZUMLANSKI, 1999). Indivíduos homozigotos para o alelo valina (Val158Val) têm apresentado maior atividade da COMT e pouca concentração de dopamina, enquanto indivíduos homozigotos para o alelo metionina (Met158Met) exibem baixa atividade da COMT e altos níveis de dopamina. Conseqüentemente, indivíduos heterozigotos demonstraram atividade intermediária da enzima (CHEN et al., 2004).

Além disso, os diferentes genótipos da COMT foram descritos por causar diferentes efeitos em tarefas numéricas e memória de trabalho em diferentes idades e sexo (PEDROSO, 2015). Diamond e colaboradores (2004), avaliando crianças entre 6 e 14 anos, identificaram que aquelas com genótipo Met158Met apresentaram maior desempenho em tarefas de memória de trabalho, em relação as crianças com genótipo Val158Val. Já as crianças heterozigotas exibiram desempenho intermediário. Wahlstrom e colaboradores (2007), em um estudo com crianças e adolescentes, de 9 a 17 anos, observaram que indivíduos homozigotos para o alelo Met apresentaram pior desempenho em tarefas de memória de trabalho e atenção, enquanto heterozigotos e homozigotos para o alelo Val obtiveram melhores resultados. Júlio-Costa e colaboradores (2013), a partir de uma amostra de crianças entre 8 e 12 anos, puderam observar que crianças com pelo menos um alelo Met apresentaram desempenho superior em relação às homozigotas para o alelo Val, em tarefas numéricas e aritméticas. Porém, nenhuma diferença foi encontrada entre os genótipos nas tarefas de memória de trabalho. Pedroso (2015), em um estudo com crianças de 6 a 14 anos, demonstrou que para meninos e crianças mais novas (6 a 9 anos), os homozigotos Val158Val apresentaram melhor desempenho da memória de trabalho. Já para meninas e crianças mais velhas (10 a 14 anos), os homozigotos Met158Met apresentaram melhor desempenho. Sugerindo que a influência do sexo possivelmente se deve às diferentes idades de início da puberdade para cada gênero.

1.4.3.1 GWAS para dificuldade de aprendizado na Matemática

Com o objetivo de identificar a contribuição das variantes genéticas para as habilidades matemáticas estudos de associação do genoma (GWAS) foram

realizados. Docherty e colaboradores (2010) investigaram 600 crianças de 10 anos de idade (300 com bom desempenho matemático e 300 com baixo desempenho). Neste estudo foram detectados 10 SNPs associados com o desempenho na Matemática. Estes SNPs foram encontrados em 10 genes diferentes (*MMP7*, *GRIK1*, *DNAH5*, *SAMD3*, *ARID1B*, *FLJ20160*, *GUCY1A2*, *NRCAM*, *DLD* e *NUAK1*). Os 10 SNPs quando combinados foram responsáveis por 2,9%. Entretanto, este estudo tem muitas falhas e não tem sido considerado. Neste estudo foram usados um dos membros de pares de gêmeos. Cuidado para não incluir o segundo gêmeo no estudo não foi tomado. Este detalhe é importante, porque a gemelaridade em si é um fator de risco para dificuldade de aprendizado. Além disto, estes indivíduos foram selecionados em função de dificuldade de aprendizado da leitura. Estes resultados refletiriam então o componente genético da DAM dentro da dislexia. Outros aspectos é que a genotipagem feita em pool, a tese à distância e a ausência de correção para múltiplas testagens.

Ludwig e colaboradores (2013), em uma amostra de crianças alemãs e austríacas com dislexia, avaliaram também às habilidades matemáticas. Para o GWAS foram feitas análises de todos os SNPs autossômicos. Os resultados sugerem que o SNP rs133885 presente no gene da Miosina 18B contribui para a DAM em crianças com dislexia. Análises nos SIP demonstraram que portadores do SNP rs133885 apresentam menor profundidade no SIP direito. O SIP direito é ativado durante o processamento numérico (CHOCHON et al., 1999; FIAS et al., 2007), sendo assim, o SNP rs133885 pode realmente estar associado à DAM.

Em 2014, foi realizado um GWAS comparando estudantes de cursos com alto nível de desempenho em atividades matemáticas vs. estudantes de cursos com pouco uso de Matemática. Foi encontrado um SNP significativamente associado, mesmo após correção para múltiplas testagens de Bonferroni, o rs789859 ($p=0,000015$). Esse SNP pode ter os alelos G ou T e é localizado em uma região intergênica do cromossomo 3q29, a aproximadamente 700 pb a montante do gene *FAM43A*, dentro de sua região regulatória, e 1,3kb a jusante de *LSG1*. Deleções e duplicações nesta região já foram associadas à dificuldade de aprendizagem, esquizofrenia e autismo. A função de *FAM43A* não é bem esclarecida, no entanto ensaios de expressão de RNA

encontrou RNA de *FAM43A* numa variedade de tecidos, incluindo tecidos do cérebro, cerebelo e medula espinhal. O SNP rs789859 está em desequilíbrio de ligação com seis outras variantes. Duas destas variantes (rs150293579 e rs1675923) mapeiam dentro de *LSG1*. Ambas variantes regulam o estado da cromatina em vários tipos de células do sistema nervoso central humano. As quatro variantes restantes mapeiam perto de *FAM43A* e também regulam estados de cromatina em tipos de células cerebrais e alteram sítios de ligação a transferrina. O fato de rs789859 estar localizado em uma região relacionada à dificuldade de aprendizado e condições neurológicas é consistente com a contribuição para a DAM (BARON-COHEN et al., 2014; CHOCHON et al., 1999; FIAS et al., 2007).

1.5 DAM e Síndromes Genéticas

Várias síndromes apresentam DAM como endofenótipo, dentre elas estão a Síndrome de Velocardiofacial, Síndrome de Sotos, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Angelman, Síndrome de Williams-Beuren, Síndrome de Turner e Síndrome do X-frágil (BRUANDET et al., 2004; DE SMEDT et al., 2009; MURPHY, 2009; OPFER; MARTENS, 2012; SEMENZA et al., 2008)

A presença da DAM em indivíduos com síndromes genéticas causadas por deleções e/ou duplicações, pode ajudar na compreensão dos processos neurobiológicos e dos mecanismos causadores de DAM. Além disso, indicam que alterações em *loci* gênicos específicos podem desencadear DAM (HAASE et al., 2012).

Diante deste contexto, Salazar (2013) avaliou a contribuição de microdeleções e microduplicações intersticiais em regiões sindrômicas para o fenótipo DAM. Foram genotipadas, através da técnica MLPA, 90 crianças com DAM e 90 controles normais, pareados por sexo, idade e turma. Em seus resultados, pequenas alterações intersticiais não contribuíram para a dificuldade de aprendizagem da Matemática.

Martins em 2014, avaliou a contribuição das expansões do trinucleotídeo CGG a 5'UTR do gene *FMR1* em uma amostra de indivíduos com DAM e em uma amostra controle. Com base nos dados analisados, foram encontrados em três indivíduos com

DAM alelos na zona intermediária, sugerindo que possivelmente alelos na zona intermediária podem contribuir para a DAM.

Carvalho e colaboradores (2014), em um estudo realizado em crianças com DAM, sugerem também que a deleção da região 22q11.2 DS (LCR22-4 para LCR22-5) pode ser uma das causas genéticas da DAM.

Considerando o aspecto multigênico envolvido na DAM, a busca constante por novas regiões genômicas e genes candidatos devem continuar. Uma ótima estratégia para identificação de novos *loci* candidatos para condições genéticas é a investigação de alterações cromossômicas. No entanto, alterações cromossômicas subteloméricas, até o presente momento, nunca foram investigadas em indivíduos portadores de DAM.

1.6 Regiões subteloméricas

Regiões subteloméricas são regiões de transição entre as sequências específicas dos cromossomos e as repetições teloméricas (LINARDOPOULOU *et al.*, 2005). São dinâmicas, heterogêneas, ricas em genes, pseudogenes e sequências repetitivas com homologia entre cromossomas homólogos e não homólogos (BEHJATI *et al.*, 2013; FLINT *et al.*, 1997; RIETHMAN, HAROLD *et al.*, 2004; RIETHMAN, H.; AMBROSINI; PAUL, 2005).

Análises comparativas das regiões subteloméricas dos cromossomas humanos 4p, 16p e 22q, que estão quase completamente sequenciados, revelaram uma estrutura comum de divisão destas regiões. A estrutura comum é dividida em dois domínios, proximal e distal, que são separados por um trecho de repetições TTAGGG degeneradas (Figura 3). As sequências do domínio distal tendem a ser curtas e repetidas em muitas outras extremidades cromossômicas. No entanto, as sequências do domínio proximal são homólogas a apenas algumas extremidades, e os blocos de homologia tendem a ser mais longos do que aqueles encontrados no domínio distal (FLINT *et al.*, 1997).

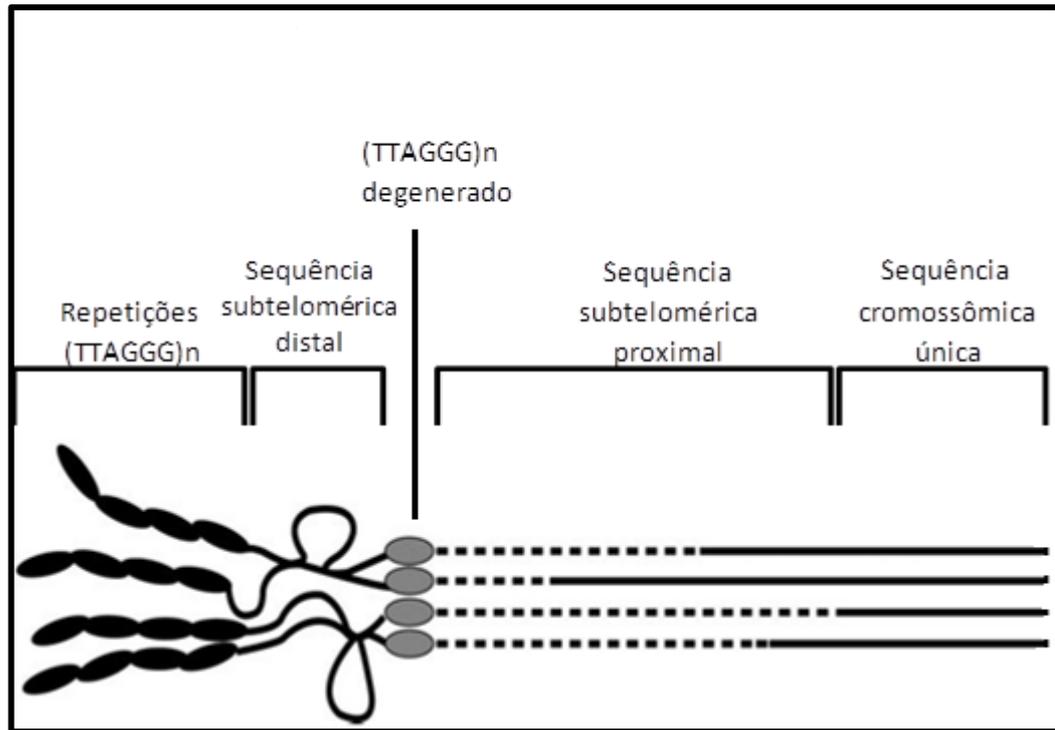


Figura 3: Organização da região subteloamérica nos cromossomas

Fonte: adaptada de Flint et al., 1997.

O compartilhamento de regiões homólogas nas regiões subteloamérica pode resultar em um pareamento cromossômico incorreto no início da prófase meiótica, predispondo a ocorrência de recombinações não-homólogas e desequilíbrio de dosagem (BEHJATI et al., 2013; KNIGHT; FLINT, 2000). Essas características tornam as regiões adjacentes aos telômeros uma candidata ao estudo de rearranjos como causa de doenças genéticas. Além disso, a pouca quantidade de histonas e nucleossomos, e a presença de vários genes e ilhas CpG, contribuem para que consequências fenotípicas causadas por deleções e duplicações nos subtelomeros sejam maiores do que aquelas envolvendo outras partes do genoma (FLINT et al., 1997; SACCONI et al., 1992).

Alterações subteloamérica específicas podem resultar em síndromes genéticas conhecidas tais como Síndrome de Cri-du-chat, Síndrome de Miller-Dieker, Síndrome de Wolf Hirschhorn, Síndrome da alfa-Talassemia/Síndrome da deleção 16pter e Síndrome da deleção 1p36. Além disso, microdeleções/microduplicações subteloamérica também já foram associadas a atraso no desenvolvimento psicomotor, deficiência intelectual, características dismórficas e outras anomalias congênitas (BRUNO et al., 2006; EGGERMANN et al., 2008).

Várias técnicas são utilizadas para a análise das regiões subteloméricas, dentre as quais se destaca a técnica de FISH (*fluorescent in-situ hybridization*); aCGH (*Microarray-based Comparative Genomic Hybridization*); e a MLPA (*Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*) (BISHOP; LU; YANKNER, 2010; KALLIONIEMI et al., 1992; PINKEL et al., 1988; SCHOUTEN et al., 2002). Neste trabalho, optamos por investigar a contribuição das microdeleções/microduplicações subteloméricas para o fenótipo DAM, através da MLPA.

1.6.1.1 Técnica de MLPA

Descrita por Schouten e colaboradores (2002), a técnica de MLPA é um método de genética molecular semi-quantitativo. Esta técnica detecta, simultaneamente, microdeleções e microduplicações de diversos genes ou mutações de ponto já conhecidas (SCHOUTEN et al., 2002; SØRENSEN et al., 2012). Atualmente, ela é comercializada pela empresa holandesa *MRC-Holland bv.* (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

A MLPA se baseia em um princípio simples, onde o DNA é desnaturado e hibridizado a uma mistura de cerca de 40 sondas. Cada sonda consiste de dois oligonucleotídeos individuais (A e B). O oligonucleotídeo A contém um marcador fluorescente (para reconhecimento à eletroforese capilar), seguido de uma sequência complementar ao iniciador universal X, além da sequência específica de hibridização ao DNA alvo. O oligonucleotídeo B, é constituído por um fragmento complementar ao iniciador universal Y, seguido de uma sequência-coringa (com extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho do fragmento final) e também uma sequência de hibridização ao DNA-alvo (Figura 4).

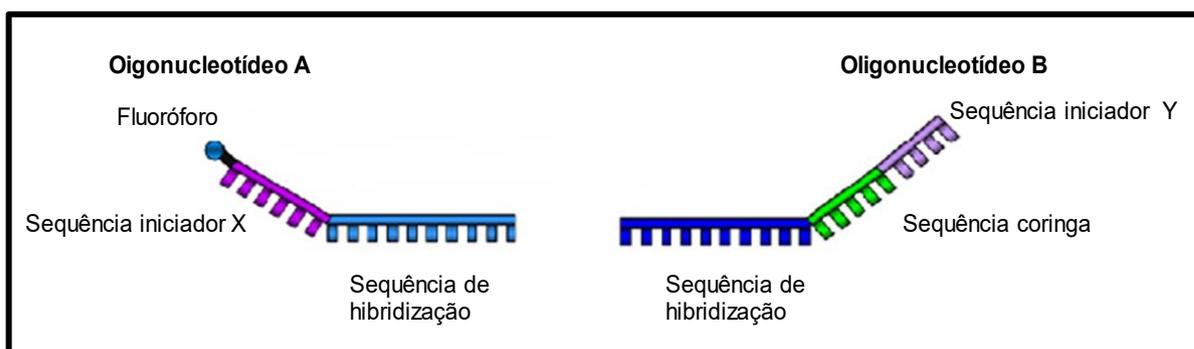


Figura 4: Constituição dos oligonucleotídeos A e B das sondas de MLPA

Fonte: adaptado de MRC-Holland (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

Quando submetidos à temperatura de anelamento, esses oligonucleotídeos se hibridizam a sequências complementares no DNA-alvo e, em temperatura ambiente, são unidos por uma enzima ligase dependente de temperatura, formando um fragmento único (Figura 5) (ROOMS; REYNIERS; KOOY, 2005; SCHOUTEN et al., 2002).

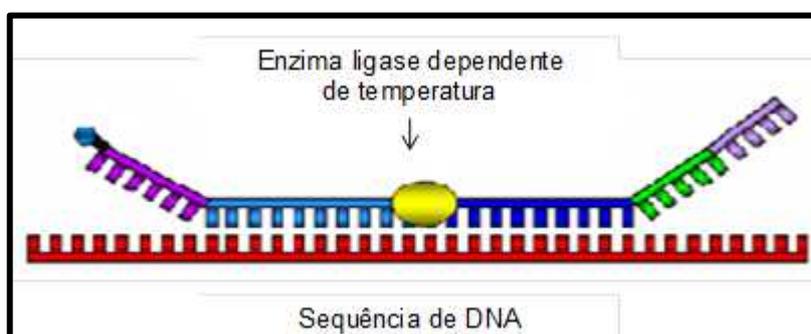


Figura 5: Hibridização e ligação dos oligonucleotídeos pela enzima DNA-ligase dependente de temperatura

Fonte: adaptado de MRC-Holland b.v. (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

O fragmento único resultante é disposto da seguinte forma: fluoróforo – região de ligação ao *primer* universal – sequência complementar ao DNA alvo – sequência coringa – região de ligação ao *primer* universal (Figura 6) (ROOMS et al., 2005; SCHOUTEN et al., 2002).

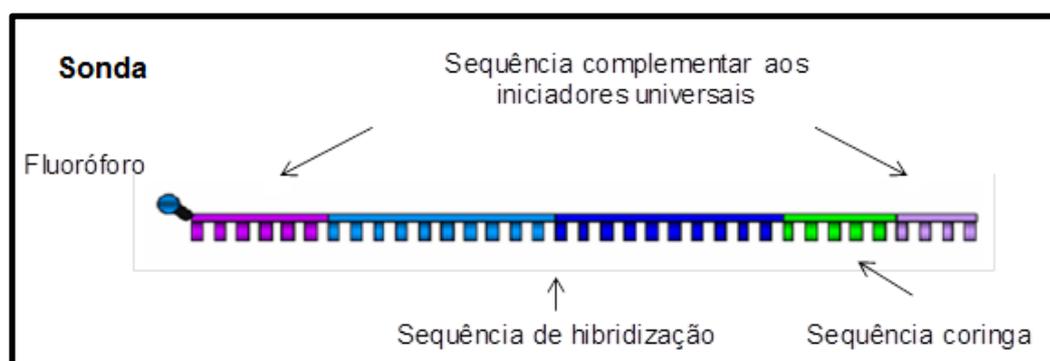


Figura 6: Disposição da sonda de MLPA em um único fragmento resultante da ligação intermediada pela enzima ligase depende de temperatura

Fonte: adaptado de MRC-Holland b.v. (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

Após a ligação, os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, utilizando os iniciadores universais, que se anelam às sequências não-homólogas, situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação (Figura 7) (ROOMS et al., 2005; SCHOUTEN et al., 2002).

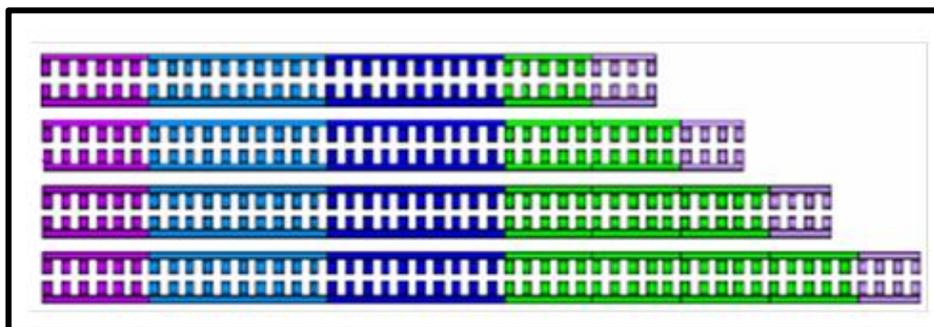


Figura 7: Resultado da amplificação de diferentes produtos de ligação, através de PCR, com a utilização de iniciadores universais

Fonte: adaptado de MRC-Holland b.v. (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

Em seguida, os produtos amplificados são separados e visualizados em um aparelho de eletroforese capilar. Os resultados são então interpretados através dos dados da área ou da altura dos picos obtidos no eletroferograma por softwares específicos.

Alguns estudos demonstraram que a técnica de MLPA possui algumas vantagens para triagem de alterações cromossômicas, quando comparada a outros métodos moleculares. Entre essas vantagens se encontra a análise de múltiplos fragmentos em uma mesma reação, utilizando baixa concentração de DNA (20 ng); rápida execução com alto grau de especificidade e confiabilidade; menor custo relativo; baixa taxa de falso-positivos; e adequação ao uso em rotinas de laboratórios de genética e pesquisa (BENDAVID et al., 2007; HOGERVORST et al., 2003; PALOMARES et al., 2006; ROOMS et al., 2004; SLATER et al., 2003)

Atualmente, diversos estudos de investigação de alterações cromossômicas subteloméricas em indivíduos com deficiência intelectual (DI) têm utilizado a técnica

de MLPA e demonstrado que, apesar de não identificar a extensão das alterações, este é um ótimo método para a triagem de microdeleções e microduplicações genômicas (CHRISTOFOLINI et al., 2010; HILA et al., 2009; ROOMS et al., 2006; SANTA MARÍA et al., 2016). Diante deste contexto, a MLPA parece ser uma técnica adequada para o rastreamento de microdeleções e microduplicações subteloméricas em indivíduos com DAM.

1.7 Justificativa e relevância

A DAM é um transtorno de aprendizagem frequente, com prevalência de 1 a 14% em crianças de idade escolar. Este transtorno é caracterizado por um desempenho em Matemática abaixo do esperado para a idade. O baixo desempenho na Matemática pode interferir negativamente na vida social, familiar, emocional, intelectual e profissional de um indivíduo. Portanto, quanto mais cedo o indivíduo é diagnosticado e encaminhado para um processo de intervenção, menos a vida e o aprendizado dele são prejudicados.

A DAM pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo fatores genéticos. No entanto, não se sabe exatamente quais genes e mecanismos moleculares estão diretamente envolvidos na etiologia da DAM. Compreender melhor a genética da DAM seria importante para estimar a contribuição dos diversos fatores de risco. Além disso, os perfis genéticos encontrados podem ser relevantes para a compreensão dos mecanismos neuropsicológicos subjacentes.

Um estudo feito por Salazar (2013) analisou a frequência de alterações intersticiais para o fenótipo DAM. Não há relatos na literatura de investigação da contribuição de alterações em regiões subteloméricas para esse fenótipo.

Regiões subteloméricas são dinâmicas, heterogêneas, ricas em genes, pseudogenes e sequências repetitivas com homologia entre cromossomas homólogos e não homólogos. A presença de homologia entre cromossomas pode gerar pareamento incorreto no início da prófase meiótica, predispondo à ocorrência de recombinações não-homólogas e desequilíbrio de dosagem.

Microdeleções e microduplicações subteloméricas são importantes causas de deficiência intelectual, portanto essas alterações podem afetar domínios cognitivos e conseqüentemente o processo de aprendizagem. A análise das regiões subteloméricas pode ser feita através de vários métodos; dentre eles, a técnica de MLPA apresenta vantagem, em função do baixo custo, para uma triagem inicial, quando não há uma suspeita clínica específica.

Diante deste contexto, a hipótese deste projeto é de que crianças com DAM ou DAME podem apresentar alterações no número de cópias das regiões subteloméricas, visto que estas regiões são responsáveis por déficits psicomotores e suas contribuições nunca foram averiguadas para o fenótipo DAM.

1.8. Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Investigar a presença de microdeleções e microduplicações subteloméricas em crianças de idade escolar com dificuldade de aprendizagem da Matemática.

1.8.2 Objetivos específicos

1. Identificar novos genes associados à DAM;
2. Buscar estabelecer correlação genótipo-fenótipo dos casos envolvidos no estudo;
3. Averiguar a frequência das microdeleções/microduplicações detectadas nos casos deste estudo, em indivíduos normais da população de Belo Horizonte.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O presente estudo é parte integrante de dois projetos: “Discalculia do Desenvolvimento em crianças de idade escolar: triagem populacional e caracterização de aspectos cognitivos e genéticos moleculares” e “Endofenótipos da dificuldade de aprendizagem da Matemática”. Ambos os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-MG) através dos pareceres nº ETIC 42/08 e 658.516, respectivamente. A participação no estudo foi condicionada à leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.2 AMOSTRA

Para realização deste estudo foram utilizados três conjuntos de amostras biológicas: dois conjuntos provenientes de estudos de base populacional e um conjunto oriundo de um ambulatório especializado em dificuldade de aprendizagem na Matemática.

2.2.1 Amostras de base populacional

Os dois conjuntos de amostras de base populacional foram obtidas a partir da coleta de dados de dois projetos dos quais este estudo faz parte. A amostra proveniente do projeto “Discalculia do Desenvolvimento em crianças de idade escolar: triagem populacional e caracterização de aspectos cognitivos e genético-moleculares” é composta por 1720 estudantes de dez escolas públicas e duas escolas particulares de Belo Horizonte-MG. Os alunos foram selecionados aleatoriamente dentre as crianças matriculadas entre a 1ª e 6ª série (2º a 7º ano) do ensino fundamental.

Já a amostra oriunda do projeto “Endofenótipos da dificuldade de aprendizagem da Matemática” é constituída, atualmente, por 254 estudantes de três escolas públicas de Belo Horizonte-MG. Os alunos foram selecionados aleatoriamente entre crianças e adolescentes matriculados na 4ª e 5ª série (3º e 4º ano) do ensino fundamental.

2.2.2 Amostra Ambulatorial

A amostra ambulatorial é composta por 25 casos de DAM, diagnosticados pelo Ambulatório NÚMERO (Laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento - Departamento de Psicologia - UFMG). O NÚMERO é especializado no atendimento de crianças e adolescentes com dificuldade de aprendizagem da Matemática e síndromes genéticas. Todas as crianças e adolescentes de 8 a 14 anos encaminhadas ao Ambulatório com suspeita de DAM são atendidas.

2.2.3 Classificação dos indivíduos

As amostras foram classificadas em casos e controles através de uma triagem inicial na qual foram avaliados: inteligência (Matrizes Progressivas Coloridas de Raven) e desempenho escolar (Teste de Desempenho Escolar - TDE).

O teste das Matrizes Progressivas Coloridas de Raven é um procedimento para avaliação da inteligência não-verbal, usando problemas de complemento de matrizes. O teste de Raven exige tanto raciocínio dedutivo quanto indutivo e constitui uma das principais medidas isoladas da inteligência geral. Os escores no teste de Raven são interpretados em percentil. Um determinado percentil indica a porcentagem de indivíduos na população cujo desempenho situa-se abaixo daquela apresentada pelo indivíduo. Por exemplo, se o escore equivale ao percentil 50, então 50% dos escores populacionais para a faixa etária situam-se abaixo daquele apresentado pelo testando. Dessa forma, tem-se que percentis abaixo de 15 representam um baixo funcionamento intelectual (ANGELINI et al., 1999).

O TDE é o único teste padronizado de desempenho escolar para uso clínico disponível no Brasil. O TDE compreende três subtestes: Leitura (de palavras isoladas), Escrita (de palavras isoladas) e Aritmética. O TDE é normatizado para as antigas 1ª a 6ª séries. Um escore abaixo do percentil 25 é interpretado como inferior, escores acima do percentil 75 são considerados como superiores e o escores entre 15 e 75 são considerados médios. No procedimento de triagem inicial deste estudo, apenas os subtestes de Aritmética e Escrita foram administrados. Dessa forma, são classificados

como DAM os probandos com $P < 25$ no subtteste de aritmética e $P > 25$ no subtteste de Escrita, e considerados DAME os probandos com $P < 25$ em ambos subttestes (Aritmética e Escrita) (STEIN, 1994; vide normas mineiras em OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2012).

Sendo assim, a amostra caso foi constituída por indivíduos conforme os critérios de inclusão listados abaixo:

- Classificação superior a P15 no teste de inteligência - Matrizes Progressivas Coloridas de Raven;
- Classificação inferior ao P25 no subtteste de Aritmética do TDE.

A amostra controle foi composta por participantes com desempenho superior ao P25 nos subttestes de escrita e aritmética do TDE.

Os participantes, que obtiveram um desempenho inferior ao percentil 15 no teste Matrizes Progressivas Coloridas de RAVEN, foram classificados como probandos com baixo funcionamento intelectual e por esse motivo foram excluídos dessa amostra.

Dos 1.999 estudantes avaliados na triagem inicial, apenas 140 crianças/adolescentes foram incluídos no grupo caso. O grupo caso foi constituído por 75 meninas e 65 meninos classificados com DAM ou DAME. Os demais, ou foram incluídos no grupo controle e ou foram excluídas devido ao baixo funcionamento intelectual.

2.3 Avaliação neuropsicológica

Com o objetivo de caracterizar o perfil cognitivo de cada um dos casos, uma avaliação neuropsicológica, organizada pela equipe do Ambulatório NÚMERO, foi realizada (Tabela 1). Essa avaliação analisa os aspectos comportamentais, emocionais, cognitivos gerais e cognitivos específicos das habilidades numéricas por meio da observação do comportamento e uso de diferentes testes. Para a comparação dos resultados dos indivíduos testados foi usado escore z (Z) por idade.

Tabela 1: Instrumentos da avaliação neuropsicológica

Domínio	Instrumento	Referência
Comportamento	SNAP-IV	Mattos <i>et al.</i> (2006)
	CBCL	Bordin <i>et al.</i> (2013); Rocha <i>et al.</i> (2013)
Ansiedade matemática	QAM	Haase <i>et al.</i> (2012); Wood <i>et al.</i> (2012)
Inteligência	WISC-IV	Rueda <i>et al.</i> (2013)
Desempenho Escolar	TDE - Leitura	Oliveira-Ferreira <i>et al.</i> (2012) Stein (1994)
	TDE - Escrita	
	TDE - Aritmética	
Destreza motora	Nine Hole Peg Test (9-HPT)	Poole <i>et al.</i> (2005)
Habilidades Visuoespaciais e Visuoconstrutivas	Figura Complexa de Rey	Rigoni (2016)
Atenção - alertness	Reação Simples	Costa <i>et al.</i> (2011)
Memória verbal e não-verbal	Dígit Span	Figueiredo & Nascimento (2007)
	Cubos de Corsi	Santos <i>et al.</i> (2005)
Funções executivas	Teste dos Cinco Dígitos	Malloy-Diniz <i>et al.</i> (2015)
Consciência Fonológica	Supressão de fonemas	Lopes-Silva <i>et al.</i> (2014)
Habilidades de Leitura	LPI	Salles <i>et al.</i> (2013)
	TDE - Leitura	Stein (1994)
	Teste de Fluência de Leitura (TFL)	Justi & Roazzi (2012)
Habilidades Numéricas	Comparação Não-Simbólica	Costa <i>et al.</i> (2011); Pinheiro-Chagas <i>et al.</i> (2014)
	Leitura de Numerais Arábicos	Moura <i>et al.</i> (2013)
	Ditado de Numerais Arábicos	Moura <i>et al.</i> (2014)
	Adição	Costa <i>et al.</i> (2011); Haase <i>et al.</i> (2014)
	Subtração	
	Multiplicação	Costa <i>et al.</i> (2011)
	Problemas	
Aritmética-WISC IV	Rueda <i>et al.</i> (2013)	

Legenda: CBCL = *Child Behaviour Checklist*; OD = ordem direta; OI = ordem inversa; MAQ = Questionário de Ansiedade Matemática; QAL = Escala de Ansiedade de leitura; SNAP-IV = TDE = Teste de Desempenho Escolar.

2.4 Coleta de dados e material biológico

A triagem inicial e as avaliações neuropsicológicas foram conduzidas por membros do Laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento (LND/FAFICH-UFMG). A equipe de avaliadores foi composta por estudantes da UFMG dos Programas de Pós-Graduação em Neurociências e Saúde da Criança e do Adolescente, sendo psicólogos ou alunos de Iniciação Científica graduandos em Psicologia da UFMG.

O material biológico das crianças/adolescentes foi coletado por estudantes da Pós-Graduação e Graduação do LND previamente capacitados. Foram coletados 5mL de sangue periférico ou saliva em tubo EDTA de todos indivíduos da presente amostra.

2.5 Métodos moleculares

2.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de precipitação salina (MILLER, S.; DYKES; POLESKY, 1988), técnica utilizada rotineiramente no laboratório LGHM, para quaisquer tipos de material biológico.

A fim de verificar a pureza e a concentração dos DNAs extraídos, foi utilizado o espectrômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

2.5.2 Genotipagem

2.5.2.1 MLPA

Para detecção de microdeleções e microduplicações subteloméricas na amostra de casos, foi utilizado o *kit* SALSA MLPA P070-B2 ou SALSA MLPA P070-B3 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Esses *kits* possibilitam a realização de ensaios de diagnóstico *in vitro* que detectam microdeleções e microduplicações nas regiões subteloméricas. Os *kits* são semelhantes e contém 46 sondas, sendo duas sondas para cada cromossomo autossômico e uma sonda para os cromossomos sexuais. Nos cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22) uma das sondas é posicionada no braço q, perto do centrômero. As sondas subteloméricas para os cromossomas

sexuais X e Y são idênticas, elas detectam sequências nas regiões pseudoautosômica (PAR1 e PAR2) (MRC-Holland; Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 19/11/2016).

O protocolo utilizado para a reação de MLPA encontra-se em conformidade ao descrito nas recomendações do fabricante, com mínimas modificações. As reações de MLPA já haviam sido padronizadas anteriormente por Salazar (2013) no laboratório LGHM (ICB/UFMG).

Como a técnica de MLPA é baseada em quantificação relativa, é necessária a utilização de amostras-controle como referência para comparação. Para isso, foram selecionados dez indivíduos controle, sem alterações genéticas nas regiões cobertas por estes kits, já disponíveis no LGHM da UFMG.

Para a realização das reações de MLPA foi utilizado o termociclador Veriti 60-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Após a reação, os produtos amplificados foram adicionados à placa de PCR, junto com o padrão de peso molecular LIZ 500 e a Formamida Hi-Di, e foram separados e visualizados no equipamento de eletroforese capilar ABI-PRISM 3730 (*Applied Biosystems*) da Plataforma Multiusuários da FIOCRUZ/MG. A interpretação dos perfis gerados foi realizada através do *software* Coffalyser (COFFA; VAN DEN BERG, 2011).

Os dados encontrados foram normalizados, dividindo-se os valores da altura do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas da amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela altura do pico da sonda correspondente nas amostras controle. Valores de picos entre 0,8 e 1,2 foram considerados normais. Valores superiores a 1,2 foram considerados indicativos de microduplicação cromossômica e valores inferiores a 0,7 foram considerados indicativos de microdeleção (TORREZAN et al., 2012).

2.5.2.2 Validação dos resultados pelo kit SALSA MLPA P036 e SYBR Green PCR-HRM

Para confirmar as deleções e duplicações encontradas com os kits SALSA MLPA 070-B2 e SALSA MLPA 070-B3, foi realizado um novo ensaio de MLPA utilizando o *kit* SALSA MLPA P036-E1. Esse *kit* também contém sondas nas regiões subteloméricas. As sondas do *kit* SALSA MLPA P036 são diferentes das sondas encontradas nos *kits* SALSA MLPA P070 (MRC-Holland).

Além disso, foi estabelecida a técnica SYBR Green PCR-HRM, que é um teste de PCR quantitativo em tempo real na presença do fluoróforo SYBR-Green seguida por análise da curva de dissociação (HRM). Essa técnica se baseia na co-amplificação de um gene de interesse e um gene de referência e na comparação dos picos das curvas de dissociação (PMc- *Peaks of the melting curve*) obtida para cada gene. A técnica SYBR Green PCR-HRM foi escolhida por apresentar baixo custo, alta sensibilidade e ser de rápida realização (TORREZAN et al., 2012).

Os iniciadores utilizados para a SYBR Green PCR-HRM foram desenhados com a ferramenta Primer-BLAST do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* levando-se em consideração os seguintes critérios (TORREZAN et al., 2012):

- O tamanho do produto de amplificação (considerando os iniciadores) tem entre 90 a 220 pb;
- O produto de amplificação para os genes de interesse e referência apresentam temperatura de dissociação com no mínimo 5°C de diferença, de modo que a identificação dos picos de dissociação do gene de interesse e do gene de referência seja possível.

Um par de iniciadores foi desenhado para cada gene de interesse, ou seja, para cada gene que apresentou variação no número de cópias através da MLPA (*VAMP7*, *S100B* e *SECTM1*, ver abaixo) (Tabela 2). Além disso, um par de iniciadores para o gene de referência, *GAPDH*, comumente usado como controle na literatura, foi customizado.

Tabela 2: Sequência de iniciadores desenhados para a reação de SYBR Green PCR-HRM

Gene	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
VAMP7	5'TGCAAAGGGAGGTAGTGTGG'	5'GGAGTTGACTGCTGACCGTA3'
S100B	5'GCCCTCATCGACGTTTTCCA3'	5'AGTTCGGATTTCTTCAGCTTGTG3'
SECTM1	5'CCGACTCACAAACCTCCAAGTA3	5'ACGCCTTAGGGACGTTTTGG3'
GAPDH	5'GCTCCACCTTTCTCATCC3'	5'CTGCAGCGTACTCCCCAC3'

Para realização da SYBR Green PCR-HRM foi utilizado o termociclador 7500 FAST Real-Time System (Applied Biosystem, Foster, EUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte. As reações foram feitas utilizando-se 50 ng de DNA, 0,15 μ M de cada iniciador e 10 μ L de SYBR® Green PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster, EUA) em um volume final de 20 μ L. A condições de amplificação foram as seguintes: 10 minutos de pré-incubação a 95°C seguida por 23 ciclos de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C.

Após a co-amplificação, os produtos de PCR foram sujeitos a um aumento gradativo e linear da temperatura, iniciando de 60°C até a 95°C a 0,1°C por segundo. As curvas de dissociação obtidas a partir da diminuição da fluorescência do SYBR-Green foram geradas utilizando o software ABI Prism 7500 (Applied Biosystems - Foster, EUA) e analisadas através do HRM *software* (Applied Biosystems - Foster, EUA).

Amostras controles foram utilizadas como referência para comparação das relações entre as alturas dos picos de dissociação. Para isso, foram selecionados sete indivíduos controles (4 do sexo feminino e 3 do sexo masculino) sem alterações genéticas detectadas pelas sondas de MLPA do *kit* SALSA MLPA P070. Os indivíduos controles foram incluídos em todas as reações.

Os dados encontrados foram normalizados, dividindo a razão entre as alturas dos picos de dissociação do alvo e referência da amostra com a razão entre as alturas dos picos de dissociação (alvo e referência) dos controles. O valor obtido corresponde ao

número de cópias do gene alvo na amostra, o que permite identificar a presença de deleções e duplicações (TORREZAN et al., 2012).

Razões entre 0,9 e 1,1 foram considerados normais (duas cópias), razões entre 0,6 e 0,7 indicam deleção de um alelo (uma cópia) e razões maiores que 1,4 indicam duplicação (três ou mais cópias). Razões que não se encontravam dentro desses intervalos foram desconsideradas e, quando possível, repetidas (TORREZAN et al., 2012).

2.5.2.3 Investigação da frequência das alterações encontradas por SYBR Green PCR-HRM

As alterações encontradas e validadas pela técnica de MLPA e SYBR Green PCR-HRM, foram investigadas na amostra controle a fim de averiguar a frequência dessas microdeleções ou microduplicações na população normal de Belo Horizonte.

Foram genotipados indivíduos escolhidas aleatoriamente da amostra controle, sendo 185 para o gene *VAMP7*, 198 para o gene *S100B*, 195 para o gene *SECTM1*. A genotipagem foi realizada através da técnica de SYBR Green PCR-HRM, utilizando os mesmos iniciadores e as mesmas condições usadas na validação das alterações.

2.6 Análise bioinformacional

Para determinar a relevância das deleções e duplicações encontradas e suas possíveis contribuições para o fenótipo DAM, alguns bancos de dados e ferramentas foram utilizados.

O banco de dados de variações gênicas patogênicas, DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans*), foi utilizado avaliação da patogenicidade das microdeleções/microduplicações encontradas (FIRTH et al., 2009). Para isso, foram analisadas pequenas CNVs, que englobam os genes alterados encontrados neste trabalho.

Posteriormente, o banco de dados DGV (*Database of Genomic Variants*), banco de dados de variação estrutural genômica não patogênica (MACDONALD et al., 2014), foi usado para averiguação da frequência de pequenas CNVs, consideradas benignas e comuns na população, que abrangem as microdeleções e microduplicações encontradas.

Por fim, a ferramenta online VarElect, que prioriza genes com base em fenótipos, foi utilizada (STELZER et al., 2016). Para essa finalidade foram selecionados genes encontrados 1 Mb proximal e 1 Mb distal dos genes com alteração encontrados. Nesta análise, foram utilizados também os seguintes termos para associação com os genes: *neurodevelopmental impariment, cognitive impariment, behavioral impariment, development dalay intellectual disability, autismo, dyslexia e specific learning difficulties.*

3 RESULTADOS

Inicialmente, 140 amostras (75 meninas e 65 meninos) com DAM ou DAME foram investigadas pela técnica de MLPA, utilizando-se o *kit* SALSA MLPA P070. Três amostras (2,14%) apresentaram alterações de número de cópias (Tabela 3).

Tabela 3: Alterações gênicas detectadas utilizando o kit de MLPA P070

Alteração gênica	Região cromossômica	Indivíduo (DNA nº.)
Del <i>VAMP7</i> (ou <i>SYBL1</i>)	PAR2 (Xq28/Yq12)	3926
Dup <i>S100B</i>	21q22.3	6545
Dup <i>SECTM1</i>	17q25.3	6615

Legenda: Del=deleção; Dup=duplicação; PAR2= região pseudoautosômica 2

Os resultados alterados estão descritos abaixo, incluindo confirmação por outras técnicas moleculares, averiguação de frequência das alterações na população normal, análises bioinformacionais e avaliação neuropsicológica.

3.1 Resultados moleculares e bioinformacionais

3.1.1 Deleção *VAMP7*

Deleção do *VAMP7* foi observada em um dos casos pelo kit SALSA MLPA P070. Essa alteração pode ser confirmada pelo kit SALSA MLPA P036 e pelo método de SYBR Green PCR-HRM. O kit SALSA MLPA P036 permitiu a confirmação da deleção por apresentar uma sonda no éxon 4 do gene *VAMP7*, diferente da presente no kit SALSA MLPA P070 que é localizada na região 3'UTR do gene (Figura 8). Na Figura 9 são apresentados os resultados das MLPAs com o kit SALSA MLPA P070 (Figura 9a), e kit SALSA MLPA P036 na amostra 3926 (Figura 9b).

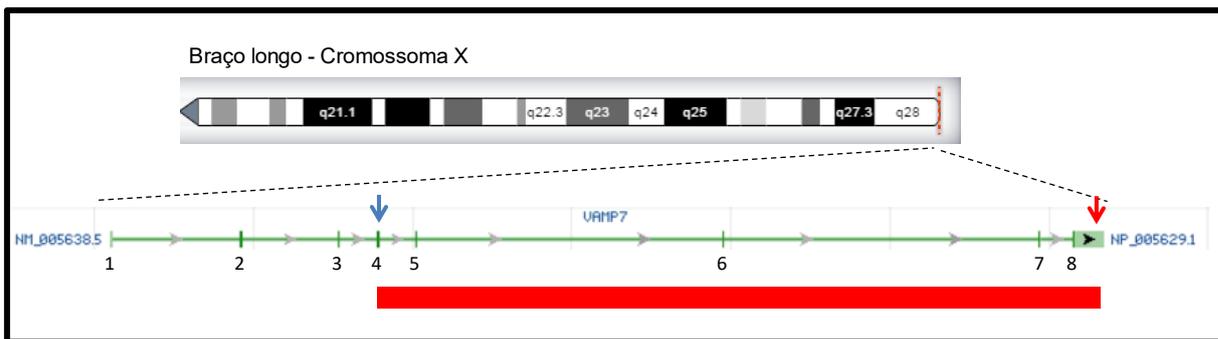


Figura 9: Disposição das sondas referentes à região Xq28/Yq12 nos kits SALSA MLPA P070 e SALSA MLPA P036

Nota: Em verde, está representado o gene *VAMP7*. Os números indicam os éxons. A seta azul indica a posição da sonda do kit SALSA MLPA P036 e a seta vermelha mostra a posição da sonda do kit SALSA MLPA P070. A barra vermelha representa o segmento mínimo deletado, de acordo com os kits de MLPAs usados. Fonte: figura gerada pela autora no Excel.

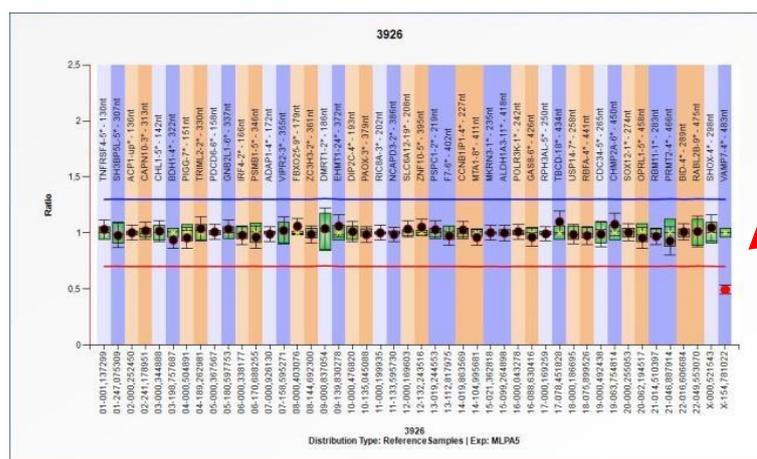
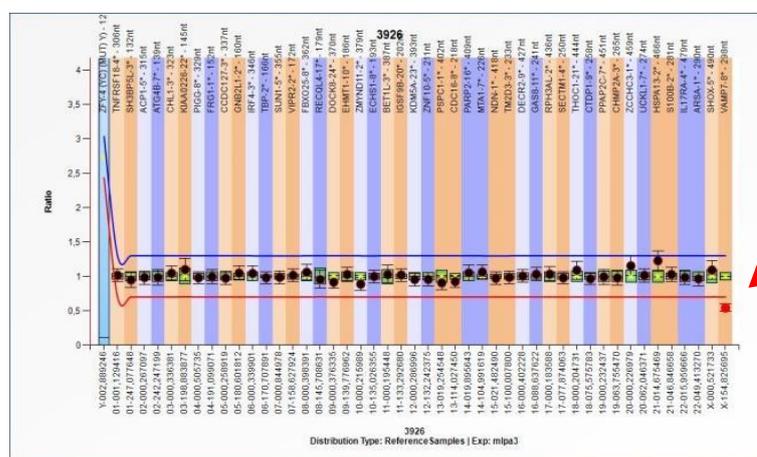


Figura 9: Deleção da sonda *VAMP7* detectada pelos kits SALSA MLPA P070 e SALSA MLPA P036 na amostra 3926

Nota: a) Gráfico de pontos com a disposição das sondas do kit SALSA MLPA P070; b), gráfico de ponto com a disposição das sondas do kit SALSA MLPA P036. As setas vermelhas apontam para a deleção da sonda *VAMP7*. Fonte: dados gerados pela autora através do software Coffalyser.

Para se estabelecer a SYBR Green PCR-HRM e validar os resultados da MLPA foram amplificados segmentos da 3'UTR do gene *VAMP7*. Na padronização inicial, utilizou-se o DNA genômico da amostra que apresentou alteração na MLPA, e três amostras controles normais. O PMc foi identificado através da representação gráfica da primeira derivada negativa da alteração de fluorescência vs. temperatura ($-dF/dT$), permitindo a discriminação de dois PMcs, um a partir do gene de referência e outro a partir do alvo-gene (Figura 10). A relação entre a altura dos PMcs alvo e referência da amostra e dos controles foram normalizada e o resultado indica a concentração relativa do gene alvo na amostra.

A amostra 3926 apresentou razão de PMc normalizada de 0,6, enquanto os controles obtiveram razões normalizadas entre 0,9 e 1,0, revelando assim uma deleção heterozigótica para a região 3'UTR do *VAMP7*.

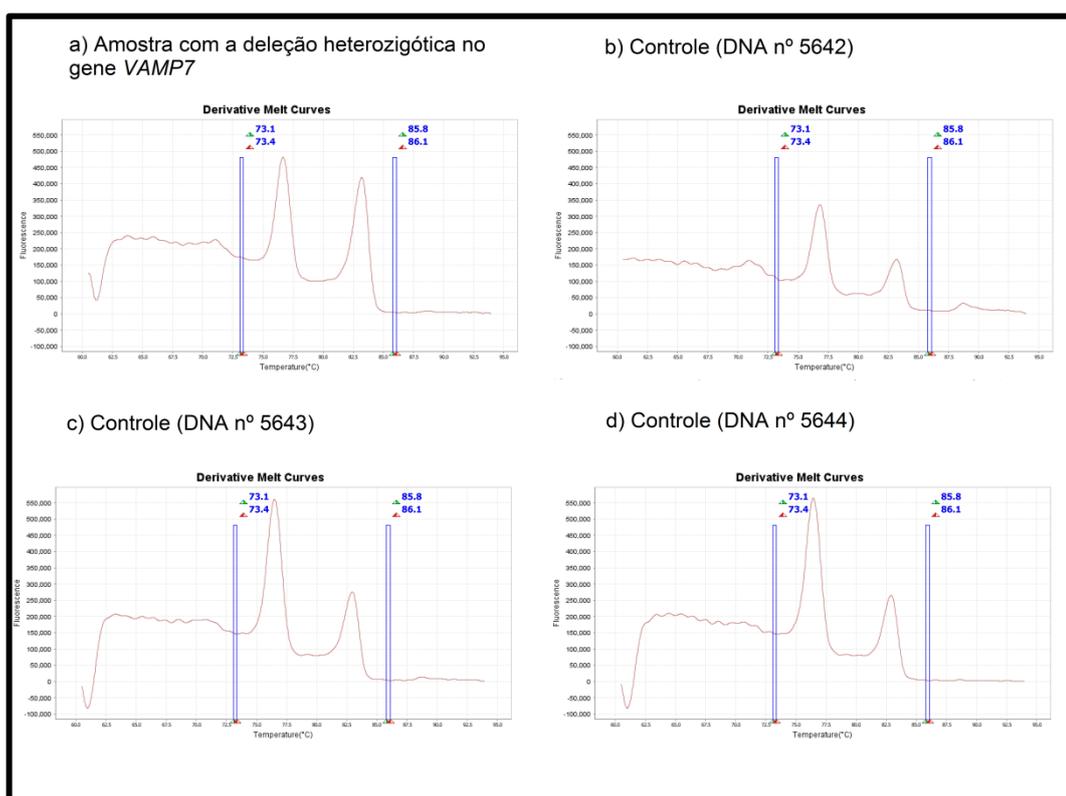


Figura 10: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene *VAMP7*

Nota: O primeiro pico das imagens corresponde à amplificação do gene *VAMP7* e o segundo ao do *GAPDH*. Na imagem (a), correspondente ao resultado da amostra 3926, a diferença entre os tamanhos dos picos é menor do que a observada nos gráficos dos três controles (b, c e d).

A frequência de microdeleções/microduplicações do gene *VAMP7* na população geral também foi averiguada usando-se a SYBR Green PCR-HRM. Foram testados 185 indivíduos normais à testagem neuropsicológica (98 do sexo feminino e 87 do sexo masculino) e sete amostras controles normais para este gene (4 sexo masculino e 3 do sexo feminino), testadas previamente pela técnica de MLPA.

Os controles normais testados apresentaram razões PMcs normalizadas de 0,9 a 1,1, e o controle positivo (amostra 3926) apresentou razão PMc normalizada de 0,6. Um indivíduo testados neuropsicologicamente apresentou razões PMc normalizada diferente das do controle. Este indivíduo apresentou razão PMc de 1,2, o que pode sugerir uma duplicação. No entanto, este resultado alterado necessita de repetição e confirmação por SYBR green PCR HRM e MLPA.

A fim de compreender a relevância da deleção encontrada e suas possíveis contribuições para o fenótipo DAM, foram analisados bancos de dados online.

No DECIPHER, banco de dados de alterações cromossômicas patogênicas, foi averiguado a presença de pequenas CNVs, abrangendo o gene *VAMP7*. Dentre os pacientes descritos no DECIPHER, doze pequenas CNVs abrangem o *VAMP7* do cromossoma X e oito pequenas CNVs, o gene do cromossoma Y. O fenótipo descrito para estes pacientes são considerados como alterações do sistema nervoso (Figura 11 e Figura 12).

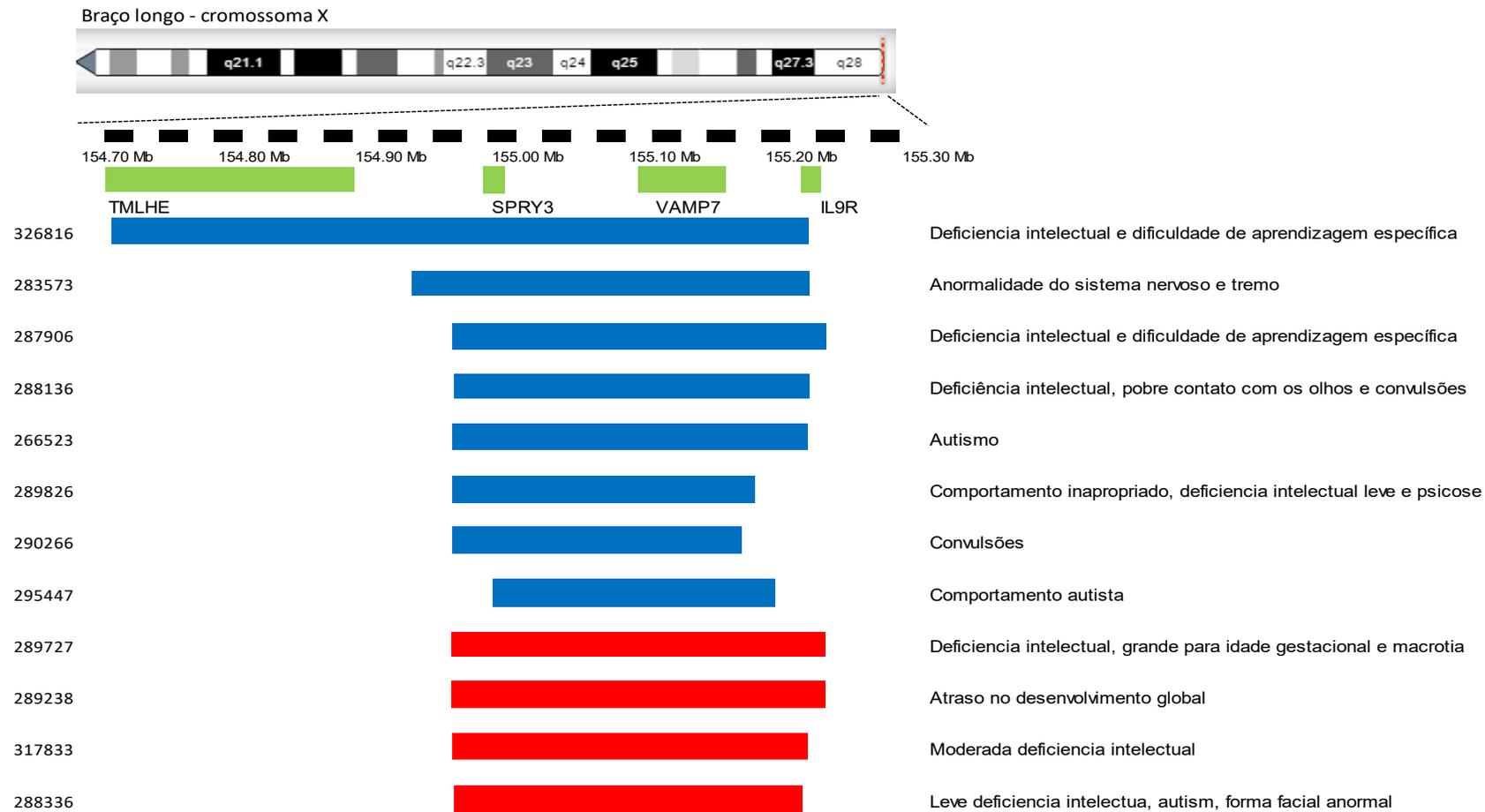


Figura 11: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene *VAMP7* no cromossoma X

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma X marcado em vermelho a região do gene *VAMP7*. Abaixo, em verde, os genes adjacentes ao *VAMP7*; As barras azuis e vermelhas se referem a deleções e duplicações, respectivamente. Os números à esquerda e os fenótipos à direita são correspondentes a cada CNV descrita no DECIPHER.

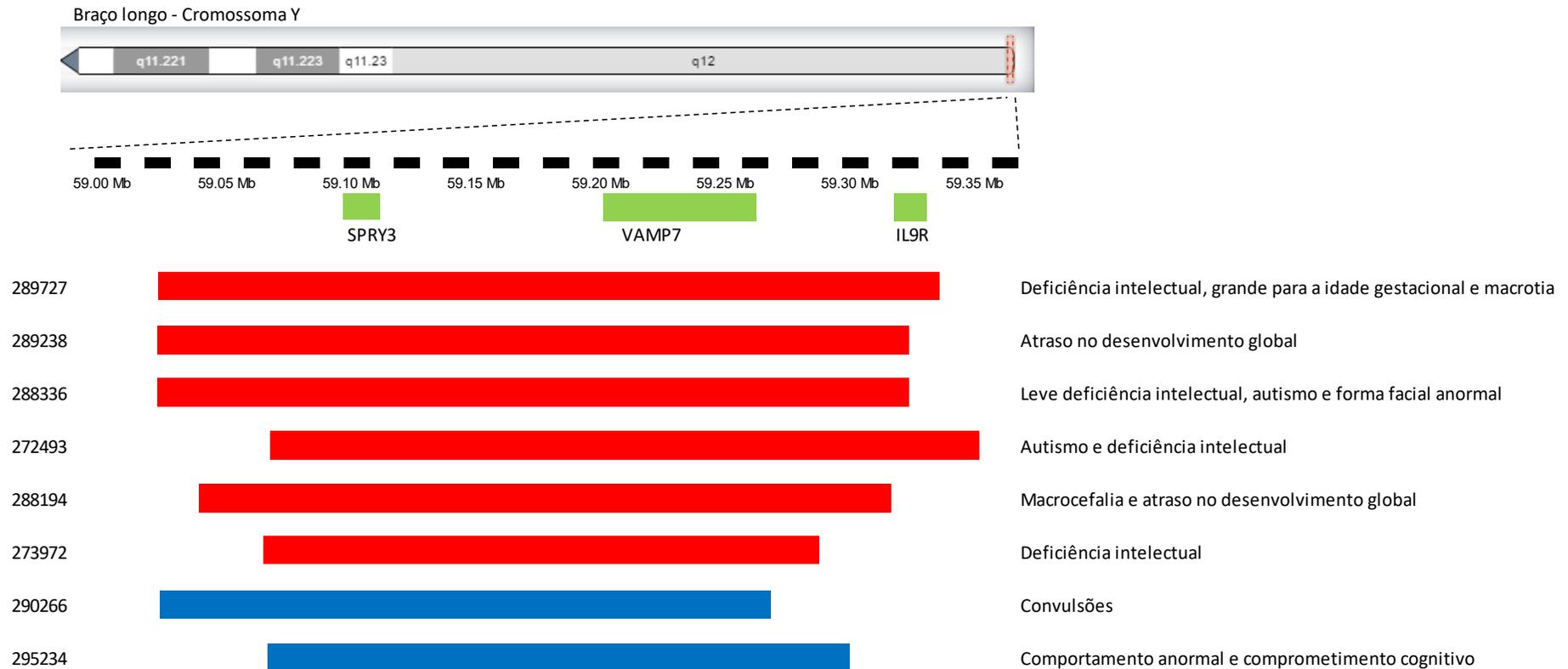


Figura 12: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene *VAMP7* no cromossoma Y

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma Y marcado em vermelho a região do gene *VAMP7*. Abaixo, em verde, os genes adjacentes ao *VAMP7*; As barras azuis e vermelhas se referem a deleções e duplicações, respectivamente. Os números à esquerda e os fenótipos à direita são correspondentes a cada CNV descrita no DECIPHER.

Para análise de alterações cromossômicas não patogênicas que incluem o gene *VAMP7*, o banco de dados de alterações cromossômicas não patogênicas, DGV, foi utilizado. Nesta análise foi avaliada a possível ausência de associação de alterações nas regiões Xq28/Yq12 com o fenótipo DAM.

Dentre os pacientes descritos no DGV, foram encontradas apenas duas pequenas CNVs que abrangem o *VAMP7* do cromossoma X. Alterações cromossômicas não patogênicas que inclui o *VAMP7* no cromossoma Y não foram descritas neste banco de dados (Figura 13).

Por fim, a ferramenta VarElect foi usada para a identificação de associação de genes a fenótipos. Foi investigado um segmento, que se estende de 1Mb proximal a 1MB distal, ao gene *VAMP7*. Nesta investigação, foram utilizados os seguintes termos para associação: *neurodevelopmental impariment, cognitive impariment, behavioral impariment, development dalay intellectual disability, autismo, dyslexia e specific learning difficulties*.

Na análise dos segmentos que incluem o *VAMP7*, foram identificados 7/27 genes no cromossoma X que são diretamente relacionados aos fenótipos usados para associação. Já, no cromossoma Y, foram encontrados 2/11 genes também associados aos termos de associação (Tabela 4).

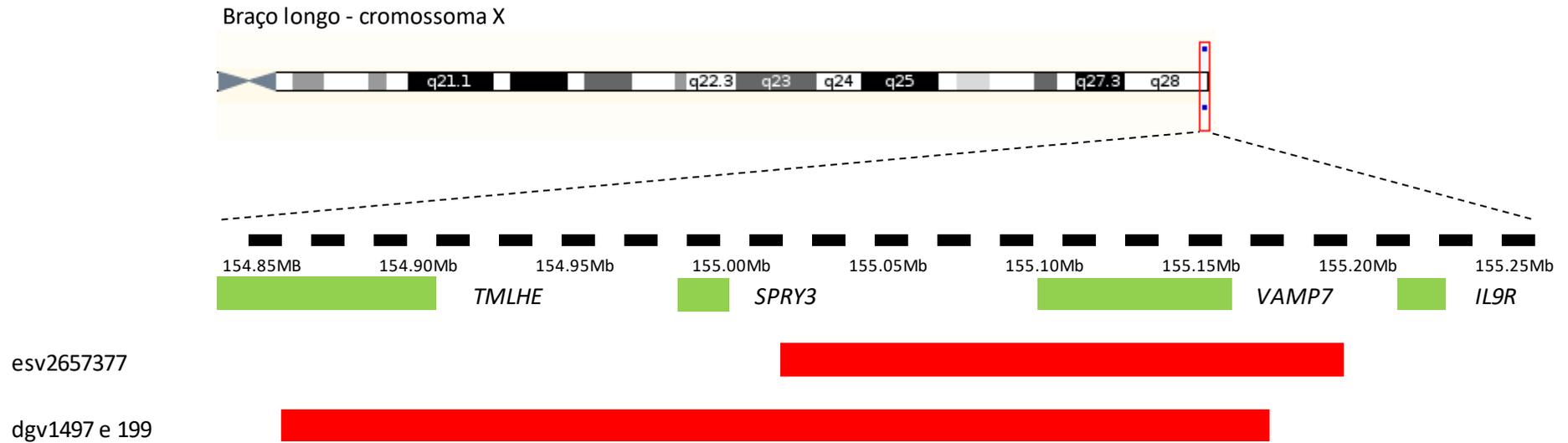


Figura 13: CNVs do cromossoma X que englobam o gene VAMP7 descritas no banco de dados DGV

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma X. Abaixo, em verde, os genes adjacentes ao VAMP7. As barras vermelhas se referem a segmentos deletados. Os números à esquerda são códigos correspondentes a cada segmento descrito no DGV.

Tabela 4: Resultado da associação de regiões adjacentes ao VAMP7 no cromossoma X e Y a fenótipos neurocognitivos

Cromossoma	Gene	Nome do gene	Fenótipos	Escore
X	RAB39B	<i>RAB39B, Member RAS Oncogene Family</i>	Deficiência cognitiva Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	55,15
X	CLIC2	<i>Chloride Intracellular Channel 2</i>	Deficiência cognitiva Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	29,13
X	TMLHE	<i>Trimethyllysine Hydroxylase, Epsilon</i>	Deficiência cognitiva Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	16,81
X	BRCC3	<i>BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3</i>	Atraso no desenvolvimento	9,77
X	VAMP7	<i>Vesicle Associated Membrane Protein 7</i>	Deficiência cognitiva Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	6,57
X	MTCP1	<i>Mature T-Cell Proliferation 1</i>	Deficiência cognitiva	1,31
X	WASH6P	<i>WAS Protein Family Homolog 6 Pseudogene</i>	Deficiência cognitiva	1,31
Y	VAMP7	<i>Vesicle Associated Membrane Protein 7</i>	Deficiência cognitiva Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	6,57
Y	WASH6P	<i>WAS Protein Family Homolog 6 Pseudogene</i>	Deficiência cognitiva	1,31

Fonte: Tabela gerada pela autora através dos dados encontrados no VarElect.

3.1.2 Duplicação S100B

Deleção do *S100B* foi observada em um dos casos pelo kit SALSA MLPA P070 (Figura 14). Esta duplicação não foi confirmada com o kit SALSA MLPA P036, pois este kit não apresenta sonda neste gene. O kit SALSA MLPA P036 apresenta uma sonda para a regiões 21q22.3, porém no gene *PRMT2* (Figura 12), que apresentou número de cópias normal neste indivíduo.



Figura 14: Duplicação da sonda S100B detectada pelo kit SALSA MLPA P070

Nota: Gráfico de pontos com a disposição das sondas do kit SALSA MLPA P070 na amostra 6545. A seta vermelha aponta para a duplicação da sonda S100B. Fonte: dados gerados pela autora através do software Coffalyser.

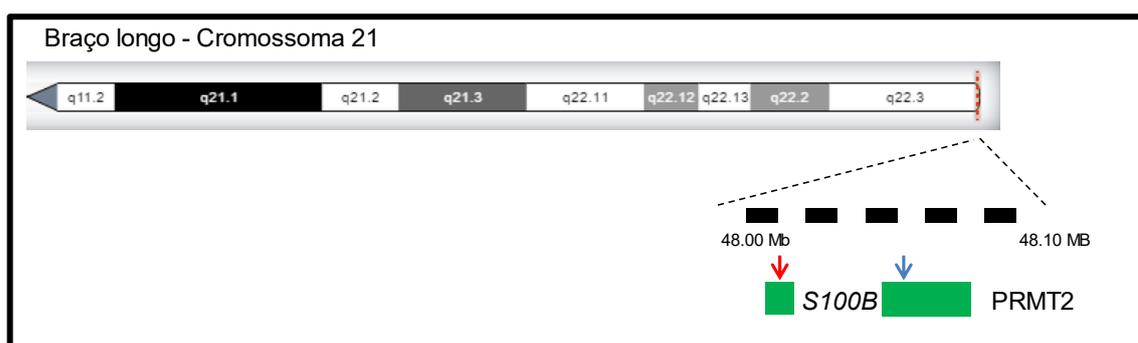


Figura 15: Posição das sondas dos kits MLPA SALSA P070 e MLPA SALSA P036 na região 21q22.3

Nota: Acima, é mostrado o braço longo do cromossomo 21. Abaixo, é mostrado, em verde, os genes *S100B* e *PRMT2*. A seta azul indica a posição da sonda do kit SALSA MLPA P036 e a seta vermelha a posição da sonda do kit SALSA MLPA P070. Fonte: figura gerada pela autora no Excel.

A confirmação da duplicação no gene *S100B* encontrada pelo kit SALSA MLPA P070 foi realizada através do método SYBR Green PCR-HRM. Para se estabelecer este método foram amplificados segmentos do gene *S100B* em três amostras controles

normais testados e na amostra que apresentou alteração na MLPA (amostra 6545). O PMc foi identificado através da representação gráfica da primeira derivada negativa da alteração de fluorescência vs. temperatura ($-dF/dT$), permitindo a discriminação de dois PMcs, um a partir do gene de referência e outro a partir do alvo-gene (Figura 15).

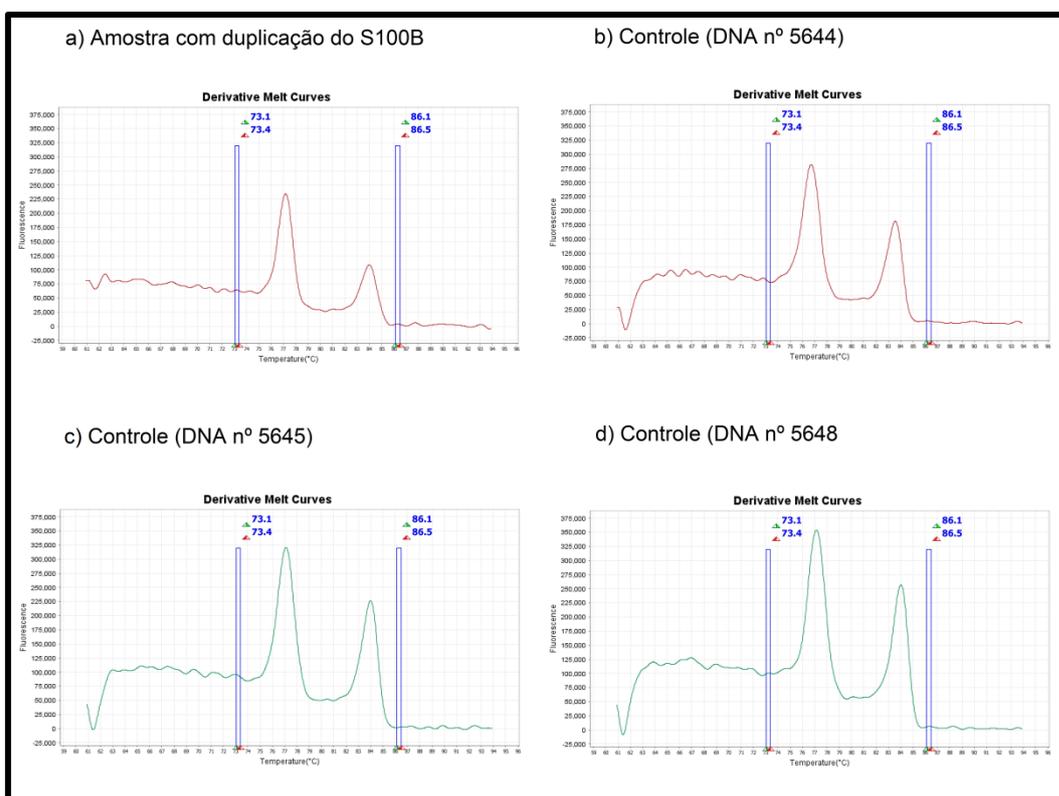


Figura 16: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene *S100B*

Nota: O primeiro pico das imagens corresponde à amplificação do gene *S100B* e o segundo ao do *GAPDH*. Na imagem (a), correspondente ao resultado da amostra 6545, a diferença entre os tamanhos dos picos é maior do que a observada nos gráficos dos três controles (b, c e d).

A amostra 6545 apresentou razão de PMc normalizada de 1,4, enquanto os controles obtiveram razões normalizadas entre 0,9 e 1,0. A diferença entre a razão de PMc dos controles e da amostra 6545, revela uma duplicação heterozigótica para o *S100B*.

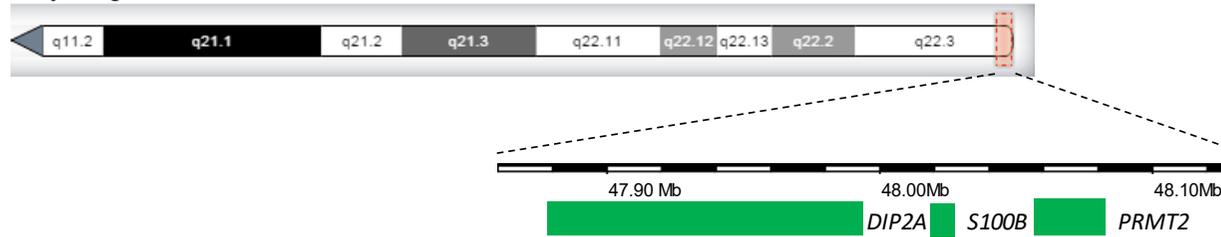
A frequência de microdeleções/microduplicações no gene *S100B* na população geral também foi averiguada usando-se as SYBR Green PCR-HRM. Foram testados 198 indivíduos normais à testagem neuropsicológica (105 do sexo feminino e 93 do sexo masculino) e sete amostras controles normais para este gene (4 sexo masculino e 3 do sexo feminino), testadas previamente pela técnica de MLPA.

Os controles normais para o gene *S100B* apresentaram razões PMcs normalizadas de 0,9 a 1,1, e o controle positivo (duplicação do *S100B*) apresentou razão PMc normalizada de 1,4. Um indivíduo testado neuropsicologicamente apresentou razões PMc normalizada de 1,2, um valor de razão intermediário em relação à razão PMc normalizada dos controles e do caso. Razões intermediárias são consideradas inconclusivas e necessitam ser repetidas e confirmadas pela SYBR Green PCR-HRM e MLPA (TORREZAN et al., 2012).

Para compreender a relevância da duplicação do gene *S100B* encontrada com o *kit* SALSA MLPA P070 e suas possíveis contribuições para o fenótipo DAM, foram analisados bancos de dados online.

No DECIPHER, banco de dados de alterações cromossômicas patogênicas, foram consideradas alterações que não incluíam o gene *PRMT2*, uma vez que o mesmo apresentou, à MLPA, número de cópias normal (duas cópias) na amostra onde foi detectada a duplicação de *S100B* (amostra. 6545). Foram encontradas no DECIPHER três CNVs que abrangiam o *S100B* e não o *PRMT2*. Apenas uma apresenta fenótipo neurológico (Figura 17).

Braço longo - Cromossoma 21



256644		Disartria e obesidade
322809		Sindactilia, anormalidade do canino e retardo de crescimento intra-uterino
289193		Amenorréia primária

Figura 17: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene *S100B* no cromossoma 21

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma 21. Abaixo, em verde, os genes *DIP2*, *S100B* E *PRMT2*; As barras azuis e vermelhas se referem a deleções e duplicações, respectivamente. Os números à esquerda e os fenótipos a direita são correspondentes a cada CNV descrita no DECIPHER.

Na investigação de pequenas CNVs que compreende o *S100B* no DGV, foram consideradas alterações que não incluíam o gene *PRMT2*, visto que ele apresenta número de cópias normal na amostra 6545. Desse modo, oito CNVs que contêm o *S100B* e não o *PRMT2* foram relatadas neste banco de dados (Figura 18).

Já para a identificação de associação de genes a fenótipos, no VarElect, foi investigado um segmento, que se estende de 1Mb proximal a 1MB distal, ao gene *S100B*. Nesta investigação, foram utilizados os seguintes termos para associação: *neurodevelopmental impariment, cognitive impariment, behavioral impariment, development dalay intellectual disability, autismo, dyslexia e specific learning difficulties*

Na verificação dos segmentos que englobam o *S100B*, no VarElect, foram identificados 9/22 genes diretamente relacionados aos fenótipos usados para associação (Tabela 5).

Braço longo - Cromossoma 21

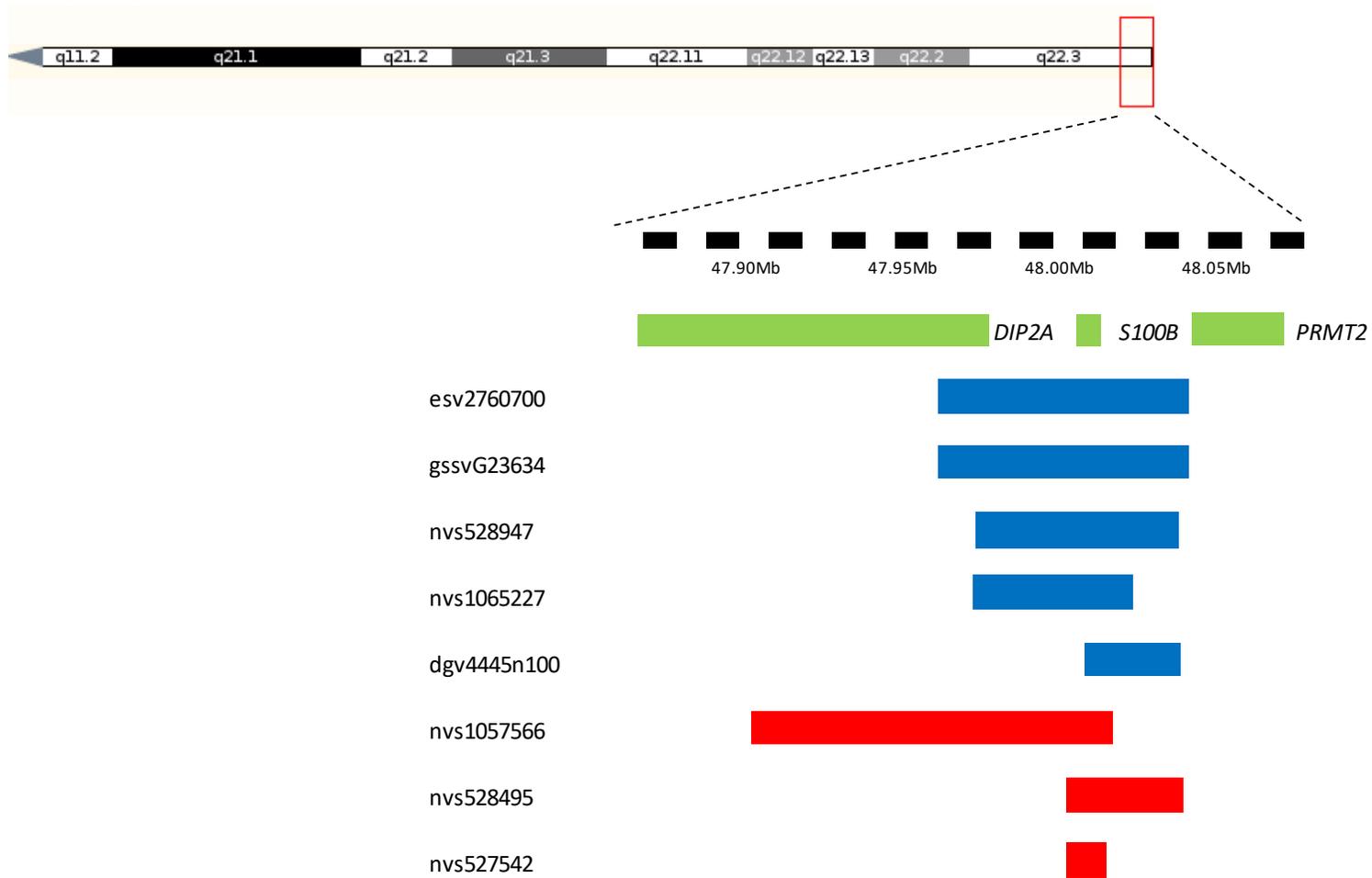


Figura 18: CNVs descritas no banco de dados DGV que abrangem o gene *S100B* e não incluem o gene *PRMT2*

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma 21. Abaixo, em verde, os genes *DIP2A*, *S100B* e *PRMT2*. As barras vermelhas e azuis se referem a segmentos deletados e duplicados, respectivamente. Os números à esquerda são códigos correspondentes a cada segmento descrito no DGV.

Tabela 5: Resultado da associação de regiões adjacentes ao gene *S100B* a fenótipos neurológicos

Cromossoma	Gene	Nome do gene	Fenótipos	Escore
21	PCNT	Pericentrin	Déficit cognitivo Alteração de Comportamento Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	42.53
21	MCM3AP	Minichromosome Maintenance Complex Component 3 Associated Protein	Déficit cognitivo Alteração de Comportamento Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	20.5
21	FTCD	Formimidoyltransferase Cyclodeaminase	Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	19.75
21	S100B	S100 Calcium Binding Protein B	Dislexia Déficit cognitivo Alteração de Comportamento Deficiência Intelectual	14.46
21	COL6A2	Collagen Type VI Alpha 2 Chain	Déficit cognitivo Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	9.45
21	LSS	Lanosterol Synthase (2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase)	Déficit cognitivo Deficiência Intelectual Atraso no desenvolvimento	8.93
21	COL6A1	Collagen Type VI Alpha 1 Chain	Déficit cognitivo Alteração de Comportamento Atraso no desenvolvimento	8.59
21	PRMT2	Protein Arginine Methyltransferase 2	Déficit cognitivo Alteração de Comportamento Atraso no desenvolvimento	6.47
21	DIP2A	Disco Interacting Protein 2 Homolog A	Dislexia	1,81

Fonte: Tabela gerada pela autora através dos dados encontrados no VarElect.

3.1.3 Duplicação SECTM1

Duplicação do gene *SECTM1* foi observada em um dos casos pelo kit SALSA MLPA P070 (Figura 19). Esta duplicação também não foi confirmada com o *kit* SALSA MLPA P036, pois este *kit* não apresenta sonda neste gene. O *kit* SALSA MLPA P036 apresenta uma sonda na região 17q25.3, porém no gene *TBCD* (Figura 20), que apresentou número de cópias normal neste indivíduo.

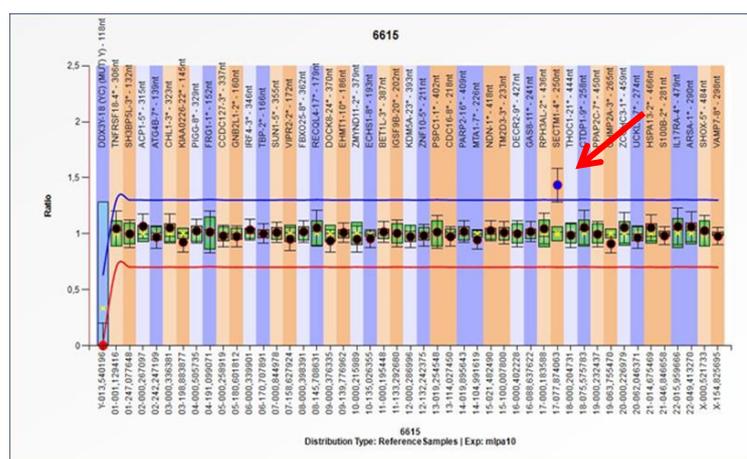


Figura 19: Duplicação da sonda SECTM1 detectada pelo kit SALSA MLPA P070

Nota: Gráfico de pontos com a disposição das sondas do *kit* SALSA MLPA P070 na amostra 6615. A seta vermelha aponta para a duplicação da sonda SECTM1. Fonte: dados gerados pela autora através do *software* Coffalyser.

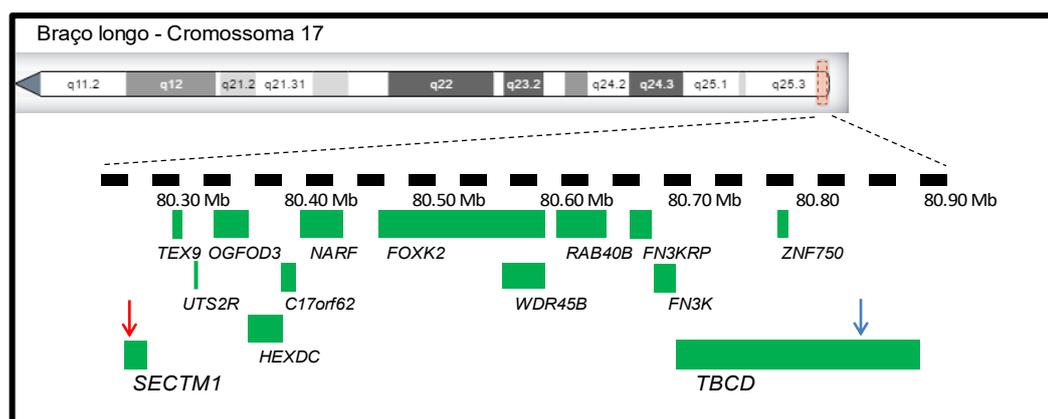


Figura 20: Posição das sondas dos kits MLPA SALSA P070 e MLPA SALSA P036 na região 17q25.3

Nota: Acima, é mostrado o braço longo do cromossoma 17. Abaixo, é mostrado, em verde, os genes. A seta azul indica a posição da sonda do *kit* SALSA MLPA P036 e a seta vermelha mostra a posição da sonda do *kit* SALSA MLPA P070. Fonte: figura gerada pela autora no Excel.

Para confirmar a duplicação encontrada e garantir maior confiabilidade dos resultados encontrados pela MLPA, foi realizada a análise da amostra alterada utilizando-se o método SYBR Green PCR-HRM. Na padronização inicial, utilizou-se o DNA genômico da amostra que apresentou duplicação do gene *S100B* (amostra 6615), e três amostras controles normais testados. A amostra 6615 apresentou razão de Pmc normalizada de 1,4, enquanto os controles obtiveram razões normalizadas entre 0,9 e 1,1, revelando assim uma duplicação heterozigótica para o gene *SECTM1*. A Figura 21 mostra os picos de dissociação para o gene *SECTM1* e *GAPDH* da amostra 6615 e dos três controles normais testados.

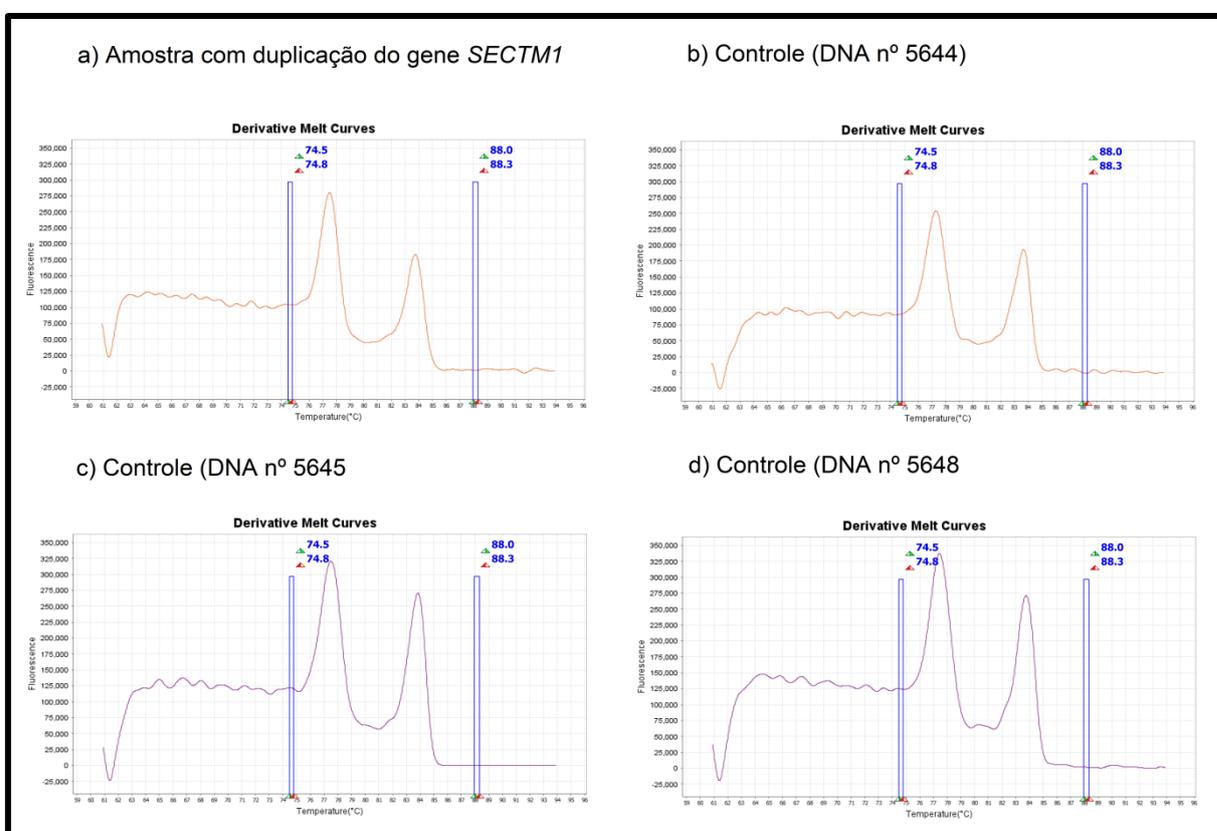


Figura 21: Resultados da SYBR Green HRM-PCR desenvolvida para o gene *SECTM1*

Nota: O primeiro pico das imagens corresponde à amplificação do gene *SECTM1* e o segundo ao do *GAPDH*. Na imagem (a), correspondente ao resultado da amostra 6615, a diferença entre os tamanhos dos picos é maior do que a observada nos gráficos dos três controles (b, c e d).

A frequência de microdeleções/microduplicações no gene *SECTM1* na população geral também foi averiguada usando-se as SYBR Green PCR-HRM. Foram testados 195 indivíduos normais à testagem neuropsicológica (110 do sexo feminino e 85 do sexo masculino) e sete amostras controles normais para este gene (4 sexo masculino e 3 do sexo feminino), testadas previamente pela técnica de MLPA.

Os controles normais para o gene *SECTM1* apresentaram razões PMcs normalizadas de 0,9 a 1,1, e o controle positivo (duplicação do *SECTM1*) apresentou razão PMc normalizada de 1,4. Um indivíduo testado neuropsicologicamente apresentou razões PMc normalizada de 1,2, um valor de razão intermediário em relação à razão PMc normalizada dos controles e do caso. Conforme citado anteriormente, razões intermediárias são consideradas inconclusivas e necessitam ser repetidas e confirmadas pela SYBR Green PCR-HRM e MLPA (TORREZAN et al., 2012).

A relevância da duplicação encontrada e suas possíveis contribuições para o fenótipo DAM também foram investigadas banco de dados online.

No DECIPHER, foram investigadas CNVs que incluíam o *SECTM1*, porém, não o gene *TBCD*, dado que o *TBCD* permaneceu com o número de cópias normal (duas cópias) na amostra 6615. Sendo assim, duas CNVs que abrangiam o *SECTM1* e não o *TBCD* foram descritas neste banco de dados. As duas alterações descritas apresentaram fenótipo concordante com alterações no sistema nervoso (Figura 22).

Na análise de pequenas CNVs descritas no DGV, que incluía o *SECTM1* e não o gene *TBCD*, encontrou-se seis CNVs (Figura 23).

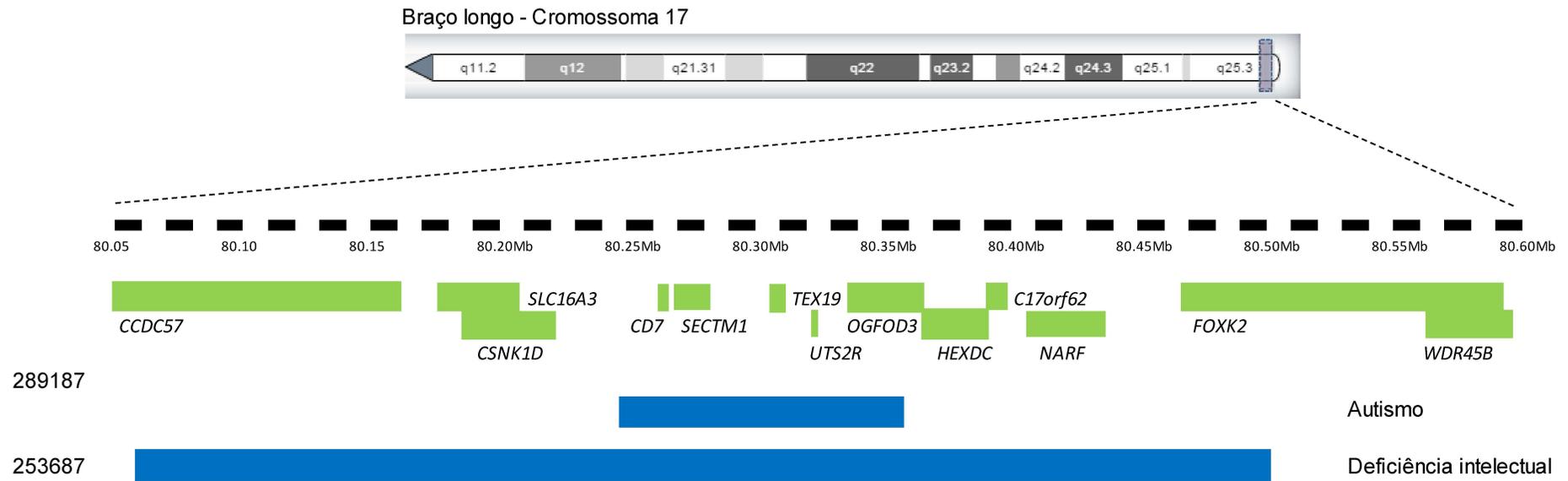


Figura 22: Pequenas CNVs descritas no DECIPHER, que englobam o gene *SECTM1* no cromossoma 17

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma 17. Abaixo, em verde, os genes adjacentes ao *SECTM1*; As barras azuis se referem a duplicações. Os números à esquerda e os fenótipos a direita são correspondentes a cada CNV descrita no DECIPHER.

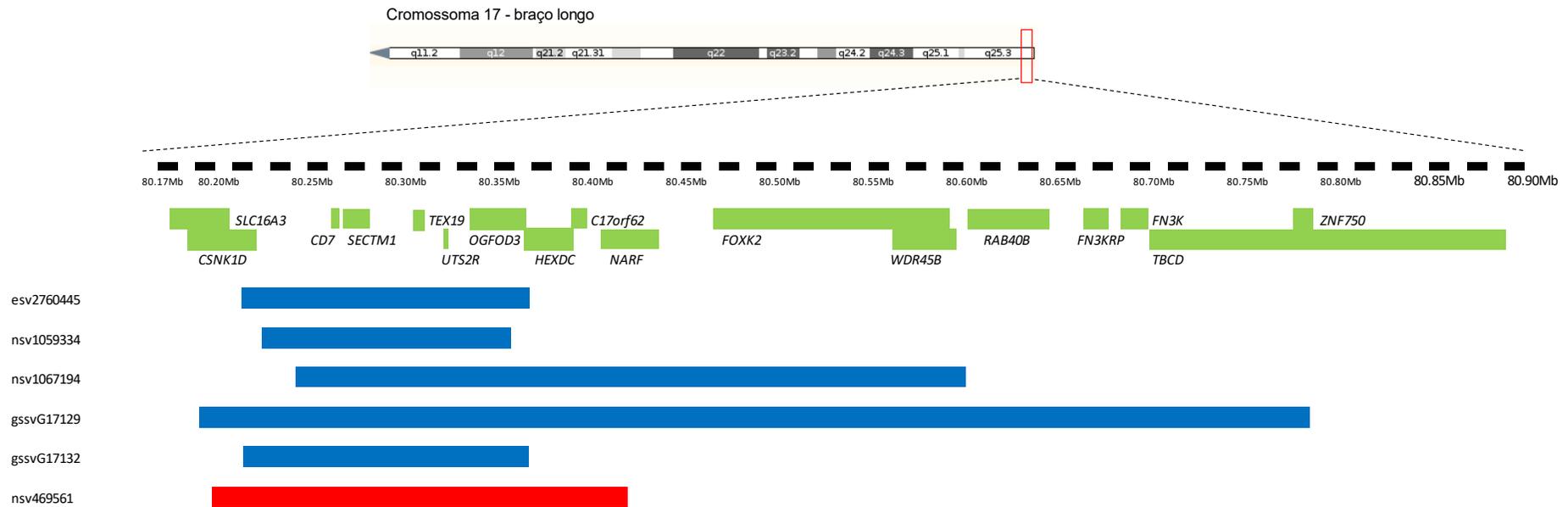


Figura 23: CNVs descritas no banco de dados DGV que abrangem o gene SECTM1 e não a região do gene TBCD rastreada pela sonda do kit SALSA MLPA P036

Legenda: Acima se encontra o braço longo do cromossoma 17. Abaixo, em verde, os genes adjacentes ao SECTM1. As barras vermelhas e azuis se referem a segmentos deletados e duplicados, respectivamente. Os números à esquerda são códigos correspondentes a cada segmento descrito no DGV.

Já para a averiguação da associação de genes a fenótipos, no VarElect, foi investigado um segmento, que se estende de 1Mb proximal a 1MB distal, ao gene *SECTM1*. Nesta investigação também foram usados os seguintes termos para associação: *neurodevelopmental impariment*, *cognitive impariment*, *behavioral impariment*, *development dalay intellectual disability*, *autismo*, *dyslexia* e *specific learning difficulties*.

Foram identificados 8/85 genes diretamente relacionados aos fenótipos usados para associação. A tabela 5 contém os principais genes relacionados aos termos de associação, como resultantes da análise.

Tabela 6: Resultado da associação de regiões adjacentes ao gene SECTM1 a fenótipos neurológicos

Cromossoma	Gene	Nome do gene	Fenótipo	Escore
17	PYCR1	Pyrroline-5-Carboxylate Reductase 1	Déficit cognitivo Deficiência intelectual Atraso no desenvolvimento	36,95
17	ACTG1	Actin Gamma 1	Déficit cognitivo Deficiência intelectual Atraso no desenvolvimento	26,18
17	P4HB	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Beta	Déficit cognitivo Deficiência intelectual Atraso no desenvolvimento	13
17	PDE6G	Phosphodiesterase 6G	Déficit cognitivo Deficiência intelectual	6,14
17	FSCN2	Fascin Actin-Bundling Protein 2, Retinal	Déficit cognitivo Deficiência intelectual	6,14
17	FAAP100	Fanconi Anemia Core Complex Associated Protein 100	Déficit cognitivo Deficiência intelectual Atraso no desenvolvimento	4,06
17	TBCD	Tubulin Folding Cofactor D	Déficit cognitivo Deficiência intelectual	4,02
17	CSNK1D	Casein Kinase 1 Delta	Déficit cognitivo	1,31

Fonte: Tabela gerada pela autora através dos dados encontrados no VarElect.

3.2 Análise Neuropsicológica

3.2.1 Deleção VAMP7

A deleção do gene VAMP7 foi identificada na amostra 3926 que corresponde ao indivíduo G.J.B.V., um jovem do sexo masculino, atualmente com 14 anos de idade. Uma avaliação neuropsicológica conduzida pelo Ambulatório NÚMERO (LND-FAFICH/UFMG) foi realizada a fim de caracterizar o perfil cognitivo deste paciente. Ele apresenta inteligência normal (QI=93; P=32; IC95%=88-93), sem presença de sintomas psiquiátricos (a partir da observação de seu comportamento e história clínica). Seu desempenho escolar, de acordo com TDE é muito inferior ao esperado para sua idade e escolaridade nos subtestes de escrita ($Z=-3,99$), leitura ($Z= -19,63$) e aritmética ($Z= -1,93$).

Quanto aos aspectos cognitivos mais intimamente relacionados às habilidades de leitura e escrita, G.J.B.V. apresentou baixo desempenho nos subtestes Leitura e Contagem do TDC ($P<5$), sendo tais subtestes, atividades que exigem do indivíduo um rápido acesso ao inventário mental de palavras. O garoto apresentou também um desempenho muito inferior ($P<2,5$) nas tarefas: Supressão de fonemas, Leitura de pseudopalavras e Leitura de palavras regulares e irregulares.

Com relação à cognição matemática, 3926 demonstrou ter preservada tanto a habilidade de distinguir magnitudes não simbólicas ($w=0,18$), quanto à habilidade de transcodificação das diferentes notações numéricas. Apesar disso, G.J.B.V. demonstrou graves dificuldades na realização das operações básicas (soma, subtração, multiplicação e divisão) de cálculos aritméticos simples e cálculos verbalmente formulados.

Também apresentou anormalidades na coordenação motora fina de ambas as mãos (Mão dominante $Z= -1,14$; Mão não-dominante $Z= -1,82$) e na memória de trabalho verbal medida pelo teste *Digit Span* em Ordem Inversa ($Z= -2,13$).

Dessa forma, concluiu-se que G.J.B.V. apresentou um perfil neuropsicológico compatível à um quadro de comorbidade do Transtorno de Aprendizagem da Leitura e Escrita e da Matemática.

3.2.2 Duplicação S100B

A duplicação do S100B foi identificada na amostra 6545 que corresponde ao indivíduo M.L.S.A, uma criança do sexo feminino, atualmente com 10 anos de idade. Uma breve avaliação neuropsicológica conduzida pelo Ambulatório NÚMERO (LND-FAFICH/UFMG) foi realizada a fim de caracterizar o perfil cognitivo de M.L.S.A. Os resultados dessa avaliação neuropsicológica indicaram inteligência normal ($P=30$), sem presença de sintomas psiquiátricos (a partir da observação de seu comportamento e história clínica). Seu desempenho escolar, de acordo com TDE é muito inferior ao esperado para sua idade e escolaridade nos subtestes de escrita ($Z=-1,62$) e aritmética ($Z=-2,8$).

Quanto aos aspectos cognitivos mais intimamente relacionados às habilidades de leitura e escrita, esta menina apresentou baixo desempenho nos subtestes Leitura e Contagem do TDE ($Z= -2,51$; $Z= -3,12$), sendo tais subtestes, atividades que exigem do indivíduo um rápido acesso ao inventário mental de palavras. A garota apresentou também um desempenho muito inferior nas tarefas: Supressão de fonemas ($Z= -1,54$), Leitura de pseudopalavras e Leitura de palavra regulares e irregulares ($P= 10$) e Fluência de Leitura ($Z=-2,83$).

Com relação à cognição matemática, esta menina demonstrou ter prejudicadas tanto a habilidade de distinguir magnitudes não-simbólicas ($w=0,52$), quanto a habilidade de transcodificação das diferentes notações numéricas. Demonstrou também graves dificuldades na realização das operações básicas (soma, subtração, multiplicação e divisão) de cálculos aritméticos simples e cálculos verbalmente formulados.

Dessa forma, concluiu-se que M.L.S.A apresenta um perfil neuropsicológico compatível a um quadro de comorbidade do transtorno de aprendizagem da Leitura e Escrita e da Matemática.

A memória de trabalho verbal medida pelo *Digit Span* em ordem direta e inversa apresentou desempenho dentro do esperado para sua idade ($Z= 0,61$; $Z=0,08$). No entanto se mostrou inferior na ordem inversa do Cubos de Corsi ($Z=-1,86$), indicando um déficit na memória de trabalho visuoespacial

3.2.3 Duplicação SECTM1

A duplicação do gene SECTM1 foi detectada na amostra 6615 que condiz com o indivíduo L.J.O., uma criança do sexo feminino com 10 anos de idade. A avaliação neuropsicológica conduzida pelo Ambulatório NÚMERO (LND-FAFICH/UFMG) indicou que L.J.O. apresenta inteligência normal ($P=60$) sem presença de sintomas psiquiátricos (a partir da observação de seu comportamento e história clínica). Seu desempenho escolar, de acordo com TDE é inferior ao esperado para sua idade e escolaridade no subtestes de aritmética ($Z=-1,68$).

Quanto aos aspectos cognitivos mais intimamente relacionados às habilidades de leitura e escrita, XXX apresentou baixo desempenho no subteste de Contagem do TDC ($Z= -3,86$), mas não no subteste de Leitura ($Z= 0,89$), sendo tais subtestes, atividades que exigem do indivíduo um rápido acesso ao inventário mental de palavras. A garota apresentou desempenho satisfatório na tarefa Leitura de pseudopalavras e Leitura de palavras regulares e irregulares ($P= 60$) e insatisfatório desempenho na tarefa de Fluência de Leitura ($Z=-1,11$).

Com relação à cognição matemática, a menina demonstrou ter prejudicadas as habilidades de distinguir magnitudes não simbólicas ($w= >0,50$), quanto a habilidade de transcodificação das diferentes notações numéricas. Demonstrou também graves dificuldades na realização das operações básicas (soma, subtração, multiplicação e divisão) de cálculos aritméticos simples e cálculos verbalmente formulados.

A memória de trabalho verbal medida pelo Digit Span em ordem direta foi dentro do esperado para sua idade ($Z= 0,61$), porém, para ordem inversa ($Z= -1,07$) apresentou desempenho abaixo do esperado. Para a memória de trabalho visuoespacial medida

pelos Cubos de corsi obteve desempenho abaixo do esperado para sua idade na ordem direta e inversa ($Z = -2,96 / Z = -1,86$).

Diante destes resultados, concluiu-se que L.J.O. não apresenta transtorno de aprendizagem da leitura e escrita. A menina apresenta um perfil neuropsicológico compatível apenas à um quadro de DAM.

4 DISCUSSÃO

Dificuldade de aprendizagem da Matemática é um transtorno cognitivo de etiologia diversificada. Vários estudos sugerem um componente genético para a DAM. A presença da DAM em pacientes portadores de síndromes genéticas tem indicado que alterações em locos gênicos específicos podem acarretar essa dificuldade. A DAM aparece frequentemente em comorbidade com dislexia (DAME) e déficit de atenção com hiperatividade.

Salazar (2013) investigou a presença de CNVs em regiões intersticiais do genoma de indivíduos com DAM, no entanto, nenhum estudo averiguou a relação de CNVs de regiões subteloméricas em indivíduos com DAM ou DAME.

Neste estudo, buscamos alterações cromossômicas em regiões subteloméricas em indivíduos portadores de DAM, através da técnica de MLPA. Dos 140 indivíduos investigados com DAM ou DAME, três (2,14%) apresentaram alterações (uma deleção no gene *VAMP7*, uma duplicação no *S100B* e uma duplicação no *SECTM1*). Apenas a deleção no *VAMP7* foi confirmada pelo *kit* SALSA MLPA P036 e todas foram confirmadas através da técnica de SYBR Green PCR-HRM.

Para investigar a frequência destas alterações na população em geral foi realizada a SYBR Green PCR-HRM em uma amostra de controles normais à testagem neuropsicológica. Resultados normais foram observados para 184/185 (*VAMP7*), 197/198 (*S100B*) e 194/195 (*SECTM1*). Os resultados fora da faixa normal não são tipicamente alterados e serão subsequentemente repetidos e confirmados.

Estes genes foram incluídos nos kits de MLPA usados por se associarem à deficiência intelectual ou alterações comportamentais. A busca de evidências adicionais para o envolvimento destes genes em distúrbios de aprendizagem incluiu a busca de microdeleções/microduplicações envolvendo estes genes em bases de dados de CNVs identificadas em indivíduos normais (DGV) ou sintomáticos (DECIPHER) e busca de associação dos genes no entorno das alterações detectadas neste trabalho com fenótipos neuropsicológicos (VarElect). A seguir, estas evidências serão

discutidas de acordo com a região, para as quais alterações foram detectadas à MLPA e confirmadas por SYBR Green PCR-HRM.

4.1 Deleção VAMP7

O indivíduo 3926 apresentou uma deleção do gene *VAMP7* (*Vesicle Associated Membrane Protein 7*). Esse gene é constituído de 8 exons e abrange uma região genômica de aproximadamente 62kb. *VAMP7* codifica uma proteína transmembranar, membro da família de receptores de Proteínas de Ligação a Fator Solúvel Sensível a N-Etilmaleimida (SNARE). Essa proteína se localiza em endossomos tardios e lisossomos e está envolvida na fusão de vesículas de transporte a suas membranas alvo (D'ESPOSITO *et al.*, 1996).

A expressão do gene *VAMP7* é ubíqua e sua proteína é altamente conservada. Sua expressão nos neurônios demonstrou desempenhar um papel importante na formação dos axônios, crescimento de neuritos e dendritos em neurônios (MARTINEZ-ARCA *et al.*, 2000 e 2001;. ALBERTS *et al.*, 2003; GUPTON e GERTLER, 2010; RACCHETTI *et al.*, 2010). Por conseguinte, a diminuição na expressão da *VAMP7* pode prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos neurônios. Diminuição de substância cinzenta (corpos celulares de neurônios) e substância branca (axônios e dendritos), além de anormalidades nas conexões de fibra nervosas entre regiões cerebrais já foram caracterizadas em indivíduos com DAM (KUCIAN, KARIN *et al.*, 2013). Por tanto, pelo menos hipoteticamente, alterações no padrão de expressão de *VAMP7* poderiam ocasionar dificuldade de aprendizagem.

O gene *VAMP7* mapeia na região pseudoautossômica 2 (PAR2). Infelizmente, não foi possível, no presente estudo, identificar qual a cópia do gene *VAMP7* se encontrada deletada, se a do cromossoma X ou a do cromossoma Y. Isto é importante, pois o gene *VAMP7* é sujeito a mecanismos epigenéticos, sendo submetido à inativação aleatória do cromossoma X nas mulheres e silenciado no cromossoma Y dos homens (MATARAZZO *et al.*, 1999). A cromatina no X inativo e nos alelos que estão no cromossoma Y do gene *VAMP7* se apresentou condensada, com as histonas H3-K9 e H4 metiladas e histonas H3 hipo-acetiladas. Em contraste, o alelo que é expresso

apresentou hiperacetilação das histonas H3 e H4 e metilação da histona H3-K4 e uma conformação da cromatina menos compactada (MATARAZZO et al., 2002). Estes autores sugeriram também que a inativação do *VAMP7* no cromossoma Y é mecanicamente semelhante aos mecanismos da inativação do cromossoma X. Sendo assim, se o alelo deletado na amostra 3926 for o alelo do cromossoma Y, é possível que não seja a causa do fenótipo observado neste rapaz.

Além disso, não conhecemos o tamanho real desta deleção na amostra 3926. Na técnica de MLPA (*kit* SALSA MLPA P070 e SALSA MLPA P036) não existe sondas em outros genes da região Xq28/Yq12 e as duas sondas representativas dessa região abrangem apenas 44kb do *VAMP7*. No entanto, acreditamos que a deleção encontrada na amostra 3926 não seja grande, pois este indivíduo não apresentou, até o momento, nenhum outro fenótipo anormal.

Para determinar a relevância da deleção e suas possíveis contribuições para o fenótipo DAM, recorreremos à busca de casos semelhantes descritos na literatura e dados disponíveis em banco de dados online.

Até à data, não foi descrito na literatura qualquer paciente cuja deleção do gene *VAMP7* seja responsável por fenótipos neurológicos e desenvolvimentais. Um estudo realizado por Danglot e colaboradores (2012) descreveu a perda de expressão da proteína *VAMP7* em camundongos *knock-out*. Neste estudo, a ausência da expressão de *VAMP7* não acarretou qualquer defeito neurológico ou desenvolvimental nos camundongos, porém induziu ao aumento da ansiedade e uma diminuição do peso cerebral. O manejo da ansiedade é um aspecto emocional que está associado à DAM, no entanto, os testes neurocognitivos do indivíduo 3926, não indicam a presença de distúrbios de ansiedade.

No banco de dados DECIPHER, foram descritas 12 pequenas CNVs envolvendo o gene *VAMP7* no cromossoma X. Indivíduos portadores dessas CNVs apresentaram vários fenótipos relacionados a alterações no sistema nervoso, o que sugere que pequenas alterações cromossômicas envolvendo o gene *VAMP7* podem ser consideradas patogênicas. Um fato intrigante, foi a descrição de 8 casos com

fenótipos que condizem com déficit no sistema nervoso, descritos no DECIPHER, envolvendo o gene *VAMP7* do cromossoma Y. Considerando a inativação da cópia do gene *VAMP7* no cromossoma Y, é possível que este seja um achado casual.

Há uma microdeleção recorrente no entorno do gene *VAMP7*, com pontos de quebra semelhantes tanto no cromossoma X quanto no Y (ver Figuras 11 e 12, acima). Esta microdeleção recorrente, entretanto, engloba parcialmente outros genes da região (*SPRY3* e *IL9R*), que poderiam estar associados ao fenótipo.

Por outro lado, na base de dados DGV, que informa apenas CNVs em indivíduos fenotipicamente normais, foram descritas duas deleções no cromossoma X, que englobam o gene *VAMP7*. Diferenciar CNVs patogênicas de não patogênicas pode ser uma tarefa bastante difícil. Uma CNV pode ser patogênica por haploinsuficiência ou por expor mutações em genes na região. Para esclarecer o significado da microdeleção presente neste paciente será necessário caracterizar a extensão da microdeleção, por aCGH, por exemplo e caracterizar o padrão de expressão da cópia do gene presente, através de PCR sensível à metilação, por exemplo.

Além disto, a análise de associações usando o VarElect apontaram alguns candidatos interessantes, próximos a *VAMP7*, que estão relacionados a fenótipos neurológicos.

É importante salientar que há um locus para dislexia, *DYX9*, proposto no cromossoma Xq distal. Este locus foi proposto com base em um estudo de ligação em uma família holandesa, através de *multipoint linkage analysis*. O mapeamento foi obtido com o marcador DXS8043 (DE KOVEL et al., 2004). Outros candidatos a dislexia também já foram apontados nesta região, como o *FMR1* e *FLNA* (POELMANS et al., 2011; REINSTEIN et al., 2012). Em outras regiões do cromossoma X, já foram apontados como candidatos os genes *DMD* e *PCDH11X*. Este último, mapeia na região pseudo-autossômica 3 (VEERAPPA; PADAKANNAYA; RAMACHANDRA, 2013).

4.2 Duplicação S100B

Foi identificada no indivíduo 6545, que é portador de DAME, uma duplicação no gene *S100B* utilizando o *kit* de MLPA P070. Este gene se localiza na extremidade do braço longo do cromossoma 21 (21q22.3). Investigação da região utilizando o *Kit* de MLPA P036 demonstrou que o número de cópias do gene distal *PRMT2* permanece normal neste indivíduo.

O gene *S100B* (*S100 Calcium Binding Protein B*) é constituído de três éxons e apresenta aproximadamente 7kb. Este gene codifica uma proteína de ligação ao cálcio da família *S100* e é altamente expresso no cérebro (ALLORE et al., 1990). A proteína *S100B* representa cerca de 0,2% do total de proteínas cerebrais e tem efeito autócrino e parácrino em neurônios, células da glia e micróglia (HEIZMANN; HUNZLKER, 1991).

No sistema nervoso central, a proteína *S100B* é expressa e secretada principalmente por astrócitos. No ambiente intracelular, *S100B* tem sido associada ao crescimento celular, diferenciação celular, estrutura celular, metabolismo energético e homeostase do cálcio (DONATO, 2001).

Além das funções intracelulares, *S100B* apresenta funções extracelulares, que são dependentes de sua concentração. A *S100B* secretada em concentrações fisiológicas (nanomolares) tem uma ação neurotrófica, enquanto as concentrações micromolares são consideradas neurotóxicas (DONATO, 2001).

O aumento crônico nos níveis de *S100B* pode causar morte neuronal via apoptose. Elevadas concentrações dessa proteína também estão presentes no sangue e fluido cerebrospinal em várias condições clínicas cerebrais, incluindo desordens psiquiátricas tais como a esquizofrenia e síndrome de Tourette (GRABE, 2001; LARA et al., 2001; VAN PASSEL et al., 2001)

Em concentrações normais, *S100B* extra-celular tem sido associado ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio em neurônios e astrócitos, e é, portanto, considerada uma proteína candidata para a sinalização glia-neurônio, que requer processos dependentes de cálcio. Além disso, tem sido descrita por atuar na

modulação da plasticidade sináptica, desenvolvendo potencial de longa duração, que é considerado como o mecanismo fisiológico subjacente à aprendizagem e à memória (NISHIYAMA et al., 2002).

No âmbito da aprendizagem, a deleção do gene *S100B* em conjunto com outros três genes (*PCNT*, *DIP2A* e *PRMT2*) contidos na região 21q22.3, que co-segrega em uma família holandesa com dislexia do desenvolvimento (POELMANS et al., 2011). Matsson et al. (2015), em um estudo genético utilizando sequenciamento de nova geração, encontraram uma variante não-codificante em *S100B*, que apresentou, associação significativa com o desempenho ortográfico em famílias de origem alemã.

A fim de encontrar mais evidências da associação do gene *S100B* como o fenótipo de dificuldade de aprendizagem, foi realizada uma busca por CNVs na região subtelomérica 21q22.3, que englobam o gene *S100B* em bases de dados específicas.

Na base de dados DECIPHER, encontramos uma CNV caracterizada por uma duplicação envolvendo apenas o gene *S100B* e que apresenta disartria e obesidade como fenótipos. Disartria é considerado um distúrbio de origem neurológica associado a alterações em estruturas do sistema nervoso central e/ou periférico envolvidas em atividades motoras. É caracterizada por uma anormalidade na execução neuromuscular da fala que pode afetar a velocidade, força, escala, sincronismo ou a exatidão de movimentos da fala. Pode afetar também a respiração, a fonação, a ressonância, a articulação e a prosódia (DUFFY, 2013).

No entanto, na base de dados DGV, foram descritas oito alterações consideradas não-patogênicas envolvendo o gene *S100B*, porém não o gene *PRMT2*. Dentre essas alterações, cinco são duplicações, que incluem todo o gene *S100B* e/ou parte do gene *DIP2A*.

Diante dos dados apresentados não podemos estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo sem antes realizamos um estudo mais aprofundado do indivíduo e seus familiares. Seria necessário a realização de um aCGH do indivíduo, a qual irá permitir a pesquisa de CNVs ao nível de todo o seu genoma e estabelecer o tamanho

aproximado da duplicação encontrada. Quantificar a proteína *S100B* no sangue do indivíduo, com o intuito de averiguar a sobreexpressão do gene *S100B*. Além disso, seria interessante analisar o material biológico dos familiares e possíveis segregações da duplicação encontrada.

4.3 Duplicação SECTM1

Foi identificada no indivíduo 6615, que é portador de DAM, uma duplicação no gene *SECTM1* utilizando-se o *kit* SALSA MLPA P070. Este gene se localiza na extremidade do braço longo do cromossoma 17 (17q25.3). Investigação da região utilizando o *kit* de MLPA P036 demonstrou também que o número de cópias do gene *TBCD*, que também se encontra nesta região, permanece normal (2 cópias) neste indivíduo.

O gene *SECTM1* (Secreted And Transmembrane 1) é formado por 5 exons e apresenta aproximadamente 14kb. Este gene codifica uma isoforma proteica transmembranar com as características de uma proteína transmembranar do tipo 1a e uma isoforma secretada (SLENTZ-KESLER; HALE; KAUFMAN, 1998). A proteína *SECTM1* pode se ligar a CD7 e estimular tanto a proliferação de células T como a secreção de citocinas (LYMAN et al., 2000). A *SECTM1* é expressa predominantemente no sangue periférico por neutrófilos e monócitos, na medula óssea e em várias linhas celulares de tumorais (ORSETTI et al., 2004; WANG et al., 2014).

Na literatura encontramos apenas um relato sobre duplicação do gene *SECTM1*. O paciente é um menino com 7 anos de idade, que apresentou leve deficiência intelectual e poucas características dismórficas (CHRISTOFOLINI et al., 2010). Rio et al. (2001) sugeriram também que a região 17q25.3 é susceptível de conter um ou mais genes sensíveis à *imprinting*, com particular importância no desenvolvimento do cérebro.

A base de dados DECIPHER relata 5 CNVs envolvendo o gene *SECTM1*, porém não o gene *TBCD* e que apresentam fenótipos neurocognitivos. Dentre essas 5 CNVs, três são maiores do que 2Mb, abrangem mais de 60 genes e apresentam outros fenótipos

físicos, que são incompatíveis ao indivíduo 6615. As outras duas CNVs restantes apresentam menos que 500kb e apenas um fenótipo (autismo ou deficiência intelectual).

No entanto, na base de dados DGV, foram descritas seis alterações consideradas não-patogênicas envolvendo o gene *SECTM1*, porém não o gene *PRMT2*. Dentre essas alterações, cinco são duplicações.

Diante dos dados apresentados não podemos estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo sem antes realizamos um estudo mais aprofundado do indivíduo e seus familiares. Seria necessário a realização de um aCGH do indivíduo, a qual irá permitir estabelecer o tamanho aproximado da duplicação encontrada.

Em síntese, em uma análise de 140 sujeitos com DAM ou DAME, 3 apresentaram microdeleção ou microduplicação subteloméricas. Uma destas está presente em uma menina com DAME, é uma duplicação envolvendo *S100B*, que já é associado à dislexia. As outras duas, ocorreram em duas regiões que são associadas a problemas cognitivos, mas não especificamente à DAM ou DAME. Em um estudo previo, já havia sido identificada uma criança com uma microdeleção em 22q11.2 (LCR22-4 a LCR22-5) e DAM (CARVALHO et al., 2014).

Sem considerarmos os dois genes que apresentam alteração no número de cópias, mas para os quais um suporte forte não foi encontrado na literatura (*VAMP7* e *SECTM1*), temos ainda 2/140 casos de DAM/DAME associados a microdeleção/microduplicação. Estes resultados sugerem que microdeleções/microduplicações sejam o fator genético identificável mais comum em distúrbios da aprendizagem da escrita e da Matemática.

5 PERSPECTIVAS

Para dar seguimento a este trabalho, será feito o aCGH destes sujeitos, para delimitar a extensão das alterações detectadas. Para o gene *VAMP7*, onde existe dúvida se o alelo deletado é o do cromossoma X ou Y, será feita uma PCR sensível à metilação, usando-se DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. Além disto, a frequência de CNVs nestes genes está sendo investigada em uma amostra de aproximadamente 6000 indivíduos genotipados com chip de alta densidade e gentilmente disponibilizados para esta análise pelo Prof. Eduardo Tarazona dos Santos. Além disto, para os três sujeitos que apresentaram resultados duvidosos ao SYBR green PCR-HRM será feita a repetição deste experimento e se os resultados não forem compatíveis com duas cópias, será feita a MLPA.

6 CONCLUSÃO

Este estudo foi o primeiro a analisar a contribuição de microdeleções/microduplicações subteloméricas em indivíduos com DAM ou DAME. Os resultados obtidos nos permitem concluir que alterações subteloméricas podem ser um componente da etiologia destes fenótipos. Nossos dados corroboram a contribuição do gene *S100B*, já associado a dislexia, também pode ser associado à DAM. Dois outros genes/regiões candidatas (*VAMP7* e *SECTM1*) emergem deste trabalho, mas dependendo de confirmação posterior.

7 REFERÊNCIAS

ALARCÓN, M. et al. A twin study of mathematics disability. **Journal of Learning Disabilities**, v. 30, n. 6, p. 617-623, 1997.

ALLORE, R. et al. Cloning and expression of the human S100 beta gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 26, p. 15537-15543, 1990.

ANGELINI, A. L. et al. Manual matrizes progressivas coloridas de Raven: escala especial. **São Paulo: Centro Editor de Testes e Pesquisas em Psicologia**, 1999.

ANSARI, D. Effects of development and enculturation on number representation in the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 278-291, 2008.

ARCHIBALD, L. M. et al. Language, reading, and math learning profiles in an epidemiological sample of school age children. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77463, 2013.

AUERBACH, R. P.; KERTZ, S.; GARDINER, C. K. Predicting adolescent risky behavior engagement: The role of cognitive vulnerability and anxiety. **International Journal of Cognitive Therapy**, v. 5, n. 3, p. 300-315, 2012.

BADIAN, N. A.; GHUBLIKIAN, M. The personal-social characteristics of children with poor mathematical computation skills. **Journal of Learning Disabilities**, v. 16, n. 3, p. 154-157, 1983.

BARON-COHEN, S. et al. A genome wide association study of mathematical ability reveals an association at chromosome 3q29, a locus associated with autism and learning difficulties: a preliminary study. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96374, 2014.

BEHJATI, F. et al. Identification of Chromosome Abnormalities in Subtelomeric Regions Using Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) Technique in 100 Iranian Patients With Idiopathic Mental Retardation. **Iran Red Crescent Med J**, v. 15, n. 10, p. e8221, Oct 2013.

BENDAVID, C. et al. MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. **Human mutation**, v. 28, n. 12, p. 1189-1197, 2007.

BERTELETTI, I.; PRADO, J.; BOOTH, J. R. Children with mathematical learning disability fail in recruiting verbal and numerical brain regions when solving simple multiplication problems. **cortex**, v. 57, p. 143-155, 2014.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 529-535, 2010.

BORDIN, Isabel A. et al. Child Behavior Checklist (CBCL), Youth Self-Report (YSR) and Teacher's Report Form (TRF): an overview of the development of the original and Brazilian versions. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 1, p. 13-28, 2013.

BRUANDET, M. et al. A cognitive characterization of dyscalculia in Turner syndrome. **Neuropsychologia**, v. 42, n. 3, p. 288-298, 2004.

BRUNO, D. L. et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140, n. 24, p. 2786-2793, 2006.

BURTON, P. R.; TOBIN, M. D.; HOPPER, J. L. Key concepts in genetic epidemiology. **The Lancet**, v. 366, n. 9489, p. 941-951, 2005.

BUTTERWORTH, B. The development of arithmetical abilities. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 3-18, 2005.

BUTTERWORTH, B. Foundational numerical capacities and the origins of dyscalculia. **Trends Cogn Sci**, v. 14, n. 12, p. 534-41, Dec 2010.

BUTTERWORTH, B.; KOVAS, Y. Understanding neurocognitive developmental disorders can improve education for all. **Science**, v. 340, n. 6130, p. 300-305, 2013.

BUTTERWORTH, B.; VARMA, S.; LAURILLARD, D. Dyscalculia: from brain to education. **science**, v. 332, n. 6033, p. 1049-1053, 2011.

BYNNER, J.; PARSONS, S. Does numeracy matter more? , 2006.

CARVALHO, M. R. et al. Are 22q11.2 distal deletions associated with math difficulties? **Am J Med Genet A**, v. 164A, n. 9, p. 2256-62, Sep 2014.

CHEN, J. et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. **The American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 5, p. 807-821, 2004.

CHOCHON, F. et al. Differential contributions of the left and right inferior parietal lobules to number processing. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 617-630, 1999.

CHRISTOFF, K.; GABRIELI, J. D. The frontopolar cortex and human cognition: Evidence for a rostrocaudal hierarchical organization within the human prefrontal cortex. **Psychobiology**, v. 28, n. 2, p. 168-186, 2000.

CHRISTOFOLINI, D. M. et al. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. **J Intellect Disabil Res**, v. 54, n. 10, p. 938-42, Oct 2010.

COFFA, J.; VAN DEN BERG, J. **Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser. NET by MRC-Holland**. INTECH Open Access Publisher, 2011. ISBN 9533079711.

COHEN KADOSH, R.; WALSH, V. Dyscalculia. **Curr Biol**, v. 17, n. 22, p. R946-7, Nov 20 2007.

COSTA, Annelise Júlio et al. A hand full of numbers: a role for offloading in arithmetics learning?. **Handy numbers: finger counting and numerical cognition**, p. 13, 2011.

DANGLLOT, Lydia et al. Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 6, p. 1962-1968, 2012.

DAUVILLIERS, Y.; TAFTI, M.; LANDOLT, H. P. Catechol-O-methyltransferase, dopamine, and sleep-wake regulation. **Sleep medicine reviews**, v. 22, p. 47-53, 2015.

DE FIGUEIREDO, Vera LM; DO NASCIMENTO, Elizabeth. Desempenhos nas duas tarefas do subteste dígitos do WISC-III e do WAIS-III. **Psicol Teor Pesqu**, v. 23, p. 313-318, 2007.

DE KOVEL, C. et al. Genomewide scan identifies susceptibility locus for dyslexia on Xq27 in an extended Dutch family. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 9, p. 652-657, 2004.

DE SMEDT, B. et al. Mathematical learning disabilities in children with 22q11. 2 deletion syndrome: a review. **Dev Disabil Res Rev**, v. 15, n. 1, p. 4-10, 2009.

DEHAENE, Stanislas. Varieties of numerical abilities. **Cognition**, v. 44, n. 1-2, p. 1-42, 1992.

DEHAENE, S. The number sense. **New York: Oxford University Press.**, 1997.

DEHAENE, S. et al. Three parietal circuits for number processing. **Cogn Neuropsychol**, v. 20, n. 3, p. 487-506, May 1 2003.

DICKINSON, D.; ELVEVAG, B. Genes, cognition and brain through a COMT lens. **Neuroscience**, v. 164, n. 1, p. 72-87, Nov 24 2009.

DIRKS, E. et al. Prevalence of combined reading and arithmetic disabilities. **Journal of Learning Disabilities**, v. 41, n. 5, p. 460-473, 2008.

DOCHERTY, S. J. et al. A genome-wide association study identifies multiple loci associated with mathematics ability and disability. **Genes Brain Behav**, v. 9, n. 2, p. 234-47, Mar 1 2010.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DOWKER, A.; BENNETT, K.; SMITH, L. Attitudes to Mathematics in Primary School Children. **Child Development Research**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

DUFFY, J. R. **Motor speech disorders: Substrates, differential diagnosis, and management**. Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 0323242642.

EGGERMANN, K. et al. Search for subtelomeric imbalances by multiplex ligation-dependent probe amplification in Silver-Russell syndrome. **Genetic testing**, v. 12, n. 1, p. 111-113, 2008.

FIAS, W. et al. Processing of abstract ordinal knowledge in the horizontal segment of the intraparietal sulcus. **J Neurosci**, v. 27, n. 33, p. 8952-6, Aug 15 2007.

FIRTH, H. V. et al. DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 4, p. 524-533, 2009.

FLINT, J. et al. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 8, p. 1305-1314, 1997.

GEARY, David C. et al. Development of number line representations in children with mathematical learning disability. **Developmental neuropsychology**, v. 33, n. 3, p. 277-299, 2008.

GEARY, D. C. Mathematical disabilities: Reflections on cognitive, neuropsychological, and genetic components. **Learning and individual differences**, v. 20, n. 2, p. 130-133, 2010.

GRABE, W. Notes toward a theory of second language writing. **On second language writing**, p. 39-57, 2001.

GROSS-TSUR, V.; MANOR, O.; SHALEV, R. S. Developmental dyscalculia: Prevalence and demographic features. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 38, n. 1, p. 25-33, 1996.

HAASE, Vitor Geraldi et al. Math self-assessment, but not negative feelings, predicts mathematics performance of elementary school children. **Child Development Research**, v. 2012, 2012.

HAASE, V. G. et al. Neuropsicologia como ciência interdisciplinar: consenso da comunidade brasileira de pesquisadores/clínicos em Neuropsicologia. **Neuropsicologia Latinoamericana**, v. 4, n. 4, 2012.

HAASE, Vitor G. et al. Contributions from specific and general factors to unique deficits: two cases of mathematics learning difficulties. 2014.

HEIZMANN, C. W.; HUNZLKER, W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. **Trends in biochemical sciences**, v. 16, p. 98-103, 1991.

HEMBREE, R. The nature, effects, and relief of mathematics anxiety. **Journal for research in mathematics education**, p. 33-46, 1990.

HILA, L. et al. MLPA subtelomere analysis in Tunisian mentally retarded patients. **Biochem Genet**, v. 47, n. 9-10, p. 727-33, Oct 2009.

HOGERVORST, F. B. et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. **Cancer research**, v. 63, n. 7, p. 1449-1453, 2003.

HOLLAR, D.; MOORE, D. Relationship of substance use by students with disabilities to long-term educational, employment, and social outcomes. **Substance use & misuse**, v. 39, n. 6, p. 931-962, 2004.

ISAACS, E. et al. Calculation difficulties in children of very low birthweight. **Brain**, v. 124, n. 9, p. 1701-1707, 2001.

JÚLIO-COSTA, Annelise et al. Count on dopamine: influences of COMT polymorphisms on numerical cognition. **Frontiers in psychology**, v. 4, p. 531, 2013.
KESSELS, Roy PC et al. The Corsi block-tapping task: standardization and normative data. **Applied neuropsychology**, v. 7, n. 4, p. 252-258, 2000.

KALLIONIEMI, A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v. 258, n. 5083, p. 818-821, 1992.

KARMILOFF-SMITH, A. Development itself is the key to understanding developmental disorders. **Trends in cognitive sciences**, v. 2, n. 10, p. 389-398, 1998.

KAROUM, F.; CHRAPUSTA, S. J.; EGAN, M. F. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: Reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. **Journal of neurochemistry**, v. 63, n. 3, p. 972-979, 1994.

KAUFMANN, L.; KUCIAN, K.; VON ASTER, M. Development of the numerical brain. In: (Ed.). **The Oxford Handbook of Numerical Cognition**, 2014.

KAUFMANN, L.; PIXNER, S.; GÖBEL, S. M. Finger usage and arithmetic in adults with math difficulties: evidence from a case report. **Handy numbers: finger counting and numerical cognition**, p. 53, 2011.

KNIGHT, S. J.; FLINT, J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. **Journal of medical genetics**, v. 37, n. 6, p. 401-409, 2000.

KODITUWAKKU, P. W. A neurodevelopmental framework for the development of interventions for children with fetal alcohol spectrum disorders. **Alcohol**, v. 44, n. 7-8, p. 717-28, Nov-Dec 2010.

KOPERA-FRYE, K.; DEHAENE, S.; STREISSGUTH, A. P. Impairments of number processing induced by prenatal alcohol exposure. **Neuropsychologia**, v. 34, n. 12, p. 1187-1196, 1996.

KOVAS, Y. et al. Overlap and specificity of genetic and environmental influences on mathematics and reading disability in 10-year-old twins. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 48, n. 9, p. 914-22, Sep 2007.

KUCIAN, K. et al. Impaired neural networks for approximate calculation in dyscalculic children: a functional MRI study. **Behav Brain Funct**, v. 2, p. 31, Sep 05 2006.

KUCIAN, K. et al. Operational momentum effect in children with and without developmental dyscalculia. 2013.

KUCIAN, K.; VON ASTER, M. Developmental dyscalculia. **European journal of pediatrics**, v. 174, n. 1, p. 1-13, 2015.

LARA, D. R. et al. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. **Journal of psychiatric research**, v. 35, n. 1, p. 11-14, 2001.

LEWIS, C.; HITCH, G. J.; WALKER, P. The prevalence of specific arithmetic difficulties and specific reading difficulties in 9-to 10-year-old boys and girls. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 283-292, 1994.

LOPES-SILVA, Júlia B. et al. Phonemic awareness as a pathway to number transcoding. 2014.

LUDWIG, K. U. et al. A common variant in myosin-18B contributes to mathematical abilities in children with dyslexia and intraparietal sulcus variability in adults. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e229, Feb 19 2013.

LYMAN, S. D. et al. Identification of CD7 as a cognate of the human K12 (SECTM1) protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3431-3437, 2000.

MACDONALD, J. R. et al. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D986-D992, 2014.

MARGARI, L. et al. Neuropsychopathological comorbidities in learning disorders. **BMC neurology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

MARTINS, A. Frequências alélicas na repetição CGG do gene FMR1 em indivíduos com desenvolvimento típico e dificuldade de aprendizado da matemática. **Dissertação (Mestrado em Genética)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MATARAZZO, M. R. et al. Human and mouse SYBL1 gene structure and expression. **Gene**, v. 240, n. 1, p. 233-238, 1999.

MATARAZZO, M. R. et al. Allelic inactivation of the pseudoautosomal gene SYBL1 is controlled by epigenetic mechanisms common to the X and Y chromosomes. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 25, p. 3191-3198, 2002.

MATSSON, Hans et al. Polymorphisms in DCDC2 and S100B associate with developmental dyslexia. **Journal of human genetics**, v. 60, n. 7, p. 399-401, 2015.

MATTOS, Paulo et al. Apresentação de uma versão em português para uso no Brasil do instrumento MTA-SNAP-IV de avaliação de sintomas de transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e sintomas de transtorno desafiador e de oposição. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Vol. 28, n. 3 (set./dez. 2006), p. 290-297**, 2006.

MAZZOCCO, M. M.; MYERS, G. F. Complexities in Identifying and Defining Mathematics Learning Disability in the Primary School-Age Years. **Ann Dyslexia**, v. 53, n. 1, p. 218-253, Jan 1 2003.

MAZZOCCO, M. M.; THOMPSON, R. E. Kindergarten predictors of math learning disability. **Learning Disabilities Research & Practice**, v. 20, n. 3, p. 142-155, 2005.

MIER, D.; KIRSCH, P.; MEYER-LINDENBERG, A. Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 918-27, Sep 2010.

MILLER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MILLER, S. P.; MERCER, C. D. Educational Aspects of Mathematics Disabilities. **Journal of Learning Disabilities**, v. 30, n. 1, p. 47-56, 1997.

MIRANDA, M. As bases genéticas da dificuldade de aprendizagem da Matemática. **Dissertação (Mestrado em Genética)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MOURA, Ricardo et al. From “Five” to 5 for 5 minutes: arabic number transcoding as a short, specific, and sensitive screening tool for mathematics learning difficulties. **Archives of Clinical Neuropsychology**, v. 30, n. 1, p. 88-98, 2015.

MOURA, Ricardo et al. Transcoding abilities in typical and atypical mathematics achievers: the role of working memory and procedural and lexical competencies. **Journal of experimental child psychology**, v. 116, n. 3, p. 707-727, 2013.

MURPHY, M. M. A review of mathematical learning disabilities in children with fragile X syndrome. **Dev Disabil Res Rev**, v. 15, n. 1, p. 21-7, 2009.

NGUYEN-LOUIE, T. T. et al. Drinkers' memory bias for alcohol picture cues in explicit and implicit memory tasks. **Drug and alcohol dependence**, v. 160, p. 90-96, 2016.

NIEDER, A. Coding of abstract quantity by 'number neurons' of the primate brain. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 199, n. 1, p. 1-16, Jan 2013.

NIEDER, A.; FREEDMAN, D. J.; MILLER, E. K. Representation of the quantity of visual items in the primate prefrontal cortex. **Science**, v. 297, n. 5587, p. 1708-1711, 2002.

NISHIYAMA, H. et al. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 4037-4042, 2002.

OLIVEIRA, Margareth et al. Validação do Teste Figuras Complexas de Rey na população brasileira. **Avaliação Psicológica**, v. 3, n. 1, p. 33-38, 2004.

OLIVEIRA-FERREIRA, Fernanda et al. School Achievement Test: Normative data for a representative sample of elementary school children. **Psychology & Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 157, 2012.

OLIVEIRA, Livia FS et al. Impaired acuity of the approximate number system in 22q11.2 microdeletion syndrome. **Psychology & Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 151, 2014.

OPFER, John E. Analyzing the number-line task: A tutorial. 2003.

OPFER, J. E.; MARTENS, M. A. Learning without representational change: development of numerical estimation in individuals with Williams syndrome. **Developmental science**, v. 15, n. 6, p. 863-875, 2012.

ORSETTI, B. et al. Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. **Cancer Res**, v. 64, n. 18, p. 6453-60, Sep 15 2004.

PALOMARES, M. et al. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. **Clinical genetics**, v. 69, n. 3, p. 228-233, 2006.

PARSONS, S.; BYNNER, J. Numeracy and employment. **Education+ Training**, v. 39, n. 2, p. 43-51, 1997.

PASSOLUNGHI, M. C. et al. Mathematics Anxiety, Working Memory, and Mathematics Performance in Secondary-School Children. **Frontiers in psychology**, v. 7, 2016.

PEARL, R. Dyscalculia: What is its prevalence? Research evidence from case studies. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 8, p. 106-113, 2010.

PINHEIRO-CHAGAS, Pedro et al. In how many ways is the approximate number system associated with exact calculation?. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111155, 2014.

POOLE, Janet L. et al. Measuring dexterity in children using the Nine-hole Peg Test. **Journal of Hand Therapy**, v. 18, n. 3, p. 348-351, 2005.

PINKEL, D. et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 23, p. 9138-9142, 1988.

POELMANS, G. et al. A theoretical molecular network for dyslexia: integrating available genetic findings. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 365-82, Apr 2011.

REINSTEIN, E. et al. Filamin A mutation associated with normal reading skills and dyslexia in a family with periventricular heterotopia. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158, n. 8, p. 1897-1901, 2012.

RIETHMAN, H. et al. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. **Genome research**, v. 14, n. 1, p. 18-28, 2004.

RIETHMAN, H.; AMBROSINI, A.; PAUL, S. Human subtelomere structure and variation. **Chromosome Res**, v. 13, n. 5, p. 505-15, 2005.

RIO, Marlène et al. Partial maternal heterodisomy of chromosome 17q25 in a case of severe mental retardation. **Human genetics**, v. 108, n. 6, p. 511-515, 2001.

ROCHA, M. M. et al. Behavioural/emotional problems in Brazilian children: findings from parents' reports on the Child Behavior Checklist. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 22, n. 4, p. 329-38, 2012.

ROOMS, L.; REYNIERS, E.; KOOY, R. F. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. **Hum Mutat**, v. 25, n. 6, p. 513-24, Jun 2005.

ROOMS, L. et al. Screening for subtelomeric rearrangements using genetic markers in 70 patients with unexplained mental retardation. **Ann Genet**, v. 47, n. 1, p. 53-9, Jan-Mar 2004.

ROOMS, L. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. **Clin Genet**, v. 69, n. 1, p. 58-64, Jan 2006.

ROTZER, S. et al. Optimized voxel-based morphometry in children with developmental dyscalculia. **Neuroimage**, v. 39, n. 1, p. 417-22, Jan 1 2008.

RUBINSTEN, O.; HENIK, A. Developmental dyscalculia: heterogeneity might not mean different mechanisms. **Trends Cogn Sci**, v. 13, n. 2, p. 92-9, Feb 2009.

RUEDA, F. J. M. et al. Escala Wechsler de Inteligência para Crianças-WISC-IV. 2013.

RYKHLEVSKAIA, E. et al. Neuroanatomical correlates of developmental dyscalculia: combined evidence from morphometry and tractography. **The developing human brain**, v. 172, 2009.

SACCONI, S. et al. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 11, p. 4913-4917, 1992.

SALAZAR, G. C. Contribuição das microdeleções/microduplicações intersticiais para o fenótipo dificuldade de aprendizagem na matemática. **Dissertação (Mestrado em Genética)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SALLES, Jerusa Fumagalli de et al. Normas de desempenho em tarefa de leitura de palavras/pseudopalavras isoladas (LPI) para crianças de 1º ano a 7º ano. **Estudos e Pesquisas em Psicologia**, v. 13, n. 2, p. 397-419, 2013.

SANTA MARÍA, L. et al. Comparison of two subtelomeric assays for the screening of chromosomal rearrangements: analysis of 383 patients, literature review and further recommendations. **Journal of applied genetics**, v. 57, n. 1, p. 63-69, 2016.

SANTOS, F. H. et al. Cross-cultural differences for three visual memory tasks in Brazilian children. **Perceptual and motor skills**, v. 101, n. 2, p. 421-433, 2005.

SCHLEGER, F. et al. Magnetoencephalographic signatures of numerosity discrimination in fetuses and neonates. **Developmental neuropsychology**, v. 39, n. 4, p. 316-329, 2014.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57-e57, 2002.

SEDÓ, M. A. de Paula JJ, Malloy-Diniz LF. O Teste dos Cinco Dígitos. São Paulo: Hogrefe; 2015.

SEDÓ, M. A. F. D. T. Test de los cinco dígitos. Manual. Madrid: TEA/Publicaciones de Psicología Aplicada, 2007.

SEDÓ, M. A. Test de las cinco cifras: una alternativa multilingüe y no lectora al test de Stroop. **Revista Española de Neurología**, v. 38, n. 9, p. 824-828, 2004.

SEMENZA, C. et al. Genetics and mathematics: evidence from Prader-Willi syndrome. **Neuropsychologia**, v. 46, n. 1, p. 206-212, 2008.

SHALEV, R. S. et al. Developmental dyscalculia: prevalence and prognosis. **European child & adolescent psychiatry**, v. 9, n. 2, p. S58-S64, 2000.

SHALEV, R. S.; GROSS-TSUR, V. Developmental dyscalculia. **Pediatric neurology**, v. 24, n. 5, p. 337-342, 2001.

SHALEV, R. S. et al. Persistence of developmental dyscalculia: What counts?: Results from a 3-year prospective follow-up study. **The Journal of Pediatrics**, v. 133, n. 3, p. 358-362, 1998.

SHI, Z.; LIU, P. Worrying Thoughts Limit Working Memory Capacity in Math Anxiety. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0165644, 2016.

SIEGLER, Robert S.; BOOTH, Julie L. Development of numerical estimation in young children. **Child development**, v. 75, n. 2, p. 428-444, 2004.

SLATER, H. et al. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 12, p. 907-912, 2003.

SLENTZ-KESLER, K. A.; HALE, L. P.; KAUFMAN, R. E. Identification and characterization of K12 (SECTM1), a novel human gene that encodes a Golgi-associated protein with transmembrane and secreted isoforms. **Genomics**, v. 47, n. 3, p. 327-340, 1998.

SØRENSEN, K. M. et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: Early diagnosis of syndromic patients. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158, n. 4, p. 720-725, 2012.

STEIN, Lílian Milnitsky. TDE: teste de desempenho escolar: manual para aplicação e interpretação. **São Paulo: Casa do Psicólogo**, p. 1-17, 1994.

STELZER, G. et al. VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. **BMC genomics**, v. 17, n. 2, p. 444, 2016.

SPREEN, Otfried; STRAUSS, Esther. **A compendium of neuropsychological tests: Administration, norms, and commentary**. Oxford University Press, 1998.

TORREZAN, G. T. et al. A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype. **BMC Med Genet**, v. 13, p. 55, Jul 16 2012.

VAN PASSEL, R. et al. S100B protein, glia and Gilles de la Tourette syndrome. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 5, n. 1, p. 15-19, 2001.

VEERAPPA, A. M.; PADAKANNAYA, P.; RAMACHANDRA, N. B. Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. **Functional & integrative genomics**, v. 13, n. 3, p. 285-293, 2013.

VERDINE, B. N. et al. Deconstructing building blocks: Preschoolers' spatial assembly performance relates to early mathematical skills. **Child development**, v. 85, n. 3, p. 1062-1076, 2014.

VON ASTER, M. G.; SHALEV, R. S. Number development and developmental dyscalculia. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 49, n. 11, p. 868-873, 2007.

WAHLSTROM, D. et al. Association of the Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene to prefrontally-mediated cognitions in adolescents. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 626-632, 2007.

WANG, T. et al. SECTM1 produced by tumor cells attracts human monocytes via CD7-mediated activation of the PI3K pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 1108-1118, 2014.

WEINSHILBOUM, R. M.; OTTERNESS, D. M.; SZUMLANSKI, C. L. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and

histamine N-methyltransferase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 19-52, 1999.

WILLCUTT, E. G. et al. Understanding the complex etiologies of developmental disorders: behavioral and molecular genetic approaches. **J Dev Behav Pediatr**, v. 31, n. 7, p. 533-44, Sep 2010.

WILSON, A. J.; DEHAENE, S. Number sense and developmental dyscalculia. **Human behavior, learning, and the developing brain: Atypical development**, v. 2, p. 212-237, 2007.

WOOD, Guilherme et al. Math anxiety questionnaire: similar latent structure in Brazilian and German school children. **Child Development Research**, v. 2012, 2012.

ZHU, B. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. **Current drug metabolism**, v. 3, n. 3, p. 321-349, 2002.