



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

NATHACHA BARETTO

**ANÁLISE DE CNVS E INDICAÇÃO CLÍNICA EM INDIVÍDUOS
COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL E OUTROS DISTÚRBIOS
DO DESENVOLVIMENTO DIAGNOSTICADOS POR CGH
*ARRAY***

Florianópolis

2015

NATHACHA BARETTO

**ANÁLISE DE CNVS E INDICAÇÃO CLÍNICA EM INDIVÍDUOS
COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL E OUTROS DISTÚRBIOS
DO DESENVOLVIMENTO DIAGNOSTICADOS POR CGH
*ARRAY***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento, sob a orientação da Professora Dr.^a Angelica Francesca Maris.

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Baretto, Nathacha

Análise de CNVs e indicação clínica em indivíduos com
deficiência intelectual e outros distúrbios do
desenvolvimento diagnosticados por CGH array / Nathacha
Baretto ; orientadora, Angelica Maris - Florianópolis, SC,
2015.

127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Deficiência intelectual. 3. CGH array. 4. CNVs. 5.
indicações clínicas. I. Maris, Angelica . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

"Análise de CNVs e indicação clínica em indivíduos com deficiência intelectual e outros distúrbios do desenvolvimento diagnosticados por CGH array"

Por

Nathacha Baretto

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (19/PBCD/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

Dr(a) Angélica Francesca Maris (BEG/CCB/UFSC)

Banca examinadora:

Dr(a) Glauber Wagner (UNOESC)

Dr(a) Yara Emelie Lofgren (BEG/CCB/UFSC)

Dr(a) Yara Costa Netto Muniz (BEG/CCB/UFSC)

Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Muller

Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 14 de Novembro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Deoclides e Nazaré, meus grandes incentivadores na vida. Sem o apoio deles nada disso estaria se tornando realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me dado forças para passar este tempo longe de casa, da família e amigos e por ter colocado pessoas tão especiais a meu lado que me ajudaram a superar estas mudanças, sem as quais não teria conseguido atingir este objetivo.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Angélica Francesca Maris, por ter confiado em mim, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desse tempo, pelas “viagens” às escolas especiais, e por tantas conversas que tínhamos nesses percursos, dos “puxões de orelha” aos conselhos, muito obrigada! Este período foi muito importante, não apenas na minha formação profissional mas também pessoal.

Ao meu grande amigo, Luan Freitas de Oliveira, companheiro de laboratório, de aulas e seminários, de tardes de estudos na biblioteca, parceiro de almoços e risadas, por toda a ajuda e incentivo que você sempre me ofereceu, espero que possamos compartilhar ainda muitos momentos juntos, muito obrigada por tudo.

À Maristela Ocampos, por toda a ajuda científica, por estar sempre disposta a passar seu conhecimento, por todas as conversas, desabafos, tardes no laboratório, almoços (que nunca me deixava pagar) o meu muito obrigado, sem sua grande ajuda com toda certeza não teria concluído este Mestrado.

Aos demais colegas do laboratório, a Mayara Anselmi ao Lucas Savaris Linhares, a Raquel Varela Onofre, ao pessoal da extensão Marcela, João e Layra, que compartilharam minhas loucuras nesta fase final de elaboração de dissertação.

Gostaria de agradecer imensamente a CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa, importante para execução deste trabalho e minha permanência nesta cidade.

Obrigada a todos os professores da Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelas disciplinas ministradas e pelos conhecimentos transmitidos.

À Ingrid Tremel Barbato e toda equipe do Laboratório Neurogene por ter confiado em mim, ter aberto as portas do laboratório e por ter cedido os resultados dos exames de CGH *array* para que esta pesquisa fosse realizada, muito obrigada!!

Aos médicos Dr. Jorge Barbato, Dr^a. Gisele de Lucca, Dr^a Louise Lapagesse, Dr^a Pricila Bernoti e Dr^a Carla Marchesini por terem conseguido um espaço nas suas agendas atribuladas para me receber e responder os questionários necessários para que este estudo pudesse se realizar, muito obrigada.

Agradeço também ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão pela aprovação do trabalho e por ter permitido meu livre acesso as áreas do hospital.

Ao meu namorado, Samuel Mansur Andrezzo, por todo amor, carinho, apoio e incentivo, sem a sua ajuda e o seu companheirismo eu não teria conseguido superar o fato de estar morando em outra cidade, onde não conhecia muito gente. Obrigada por estar ao meu lado, em todos os momentos alegres ou difíceis e por sempre acreditar no meu potencial.

A minha segunda família Joice Menezes Mansur Andrezzo, Tadeu Aguiar Andrezzo e Gabriel Mansur Andrezzo por me acolherem na sua casa, por sempre me incentivarem a continuar e persistir nos meus objetivos, e por deixar os meus finais de semana mais felizes.

As pessoas mais importantes da minha vida, meus exemplos de caráter, amor, carinho e dedicação, meus pais, Deoclides Baretto e Nazaré Aura Gonçalves Baretto. Obrigada por sempre buscarem o melhor para mim, muitas vezes abrindo mão dos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, e por sempre incentivarem o meu crescimento pessoal e profissional, acompanhando e se preocupando, mesmo de longe, para que não me faltasse nada, para que eu me sentisse bem. Amo vocês com toda a força do meu coração!

Às minhas queridas irmãs Kelfany Lima e Naiade Baretto por todo carinho, amizade, incentivo, compreensão, por estarem sempre ao meu lado, sei que posso contar sempre com vocês. Muito obrigada, amo vocês.

A minha vizinha Aura *in memmorian*, tenho certeza que lá do céu ela iluminou meu caminho e me deu forças, nos momentos de dificuldade. Amor eterno, saudades.

Agradeço em especial aos membros da banca, Prof. Dr. Glauber Wagner, Prof^a Dr^a Yara Costa Netto Muniz e Prof^a. Dr^a. Sara Lofgren, por cordialmente aceitarem corrigir esta dissertação. Considerações que com certeza serão muito bem-vindas para a melhoria deste trabalho.

Obrigada a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”

João Guimarães Rosa

RESUMO

BARETTO, N. **Análise de CNVs e indicação clínica em indivíduos com deficiência intelectual e outros distúrbios do desenvolvimento diagnosticados por CGH Array**. Florianópolis, 2015. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.

A deficiência intelectual (DI) é caracterizada por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, origina-se antes dos 18 anos de idade e afeta cerca de 1 a 3% da população do Mundo e 1,37% da população brasileira. As causas etiológicas da DI são variadas e de difícil identificação, devido a sua heterogeneidade. Entre as causas genéticas, a variação no número de cópias (CNVs) de trechos do DNA no genoma vem sendo amplamente estudada em distúrbios do desenvolvimento, através da técnica de hibridização comparativa por *arrays* (CGH *array*). CNVs são comumente classificadas como benignas (CNVs comum), de significado clínico incerto (raras), potencialmente patogênicas (raras) e patogênicas (raras). O presente estudo teve como objetivo avaliar as CNVs encontradas em indivíduos com DI e distúrbios do desenvolvimento e interpretar a sua contribuição para o aparecimento do fenótipo. Foram analisados 109 resultados de exames de CGH *array*, realizados pelo Laboratório de Genética Humana Neurogene, em Santa Catarina, com as informações clínicas e fenotípicas fornecidas através do preenchimento de questionários pelos médicos responsáveis pela solicitação dos exames. Houve uma prevalência de dois terços do sexo masculino na população estudada, sendo que os principais fenótipos que levaram a solicitação da investigação foram ADNPM, dismorfias de cabeça e face e DI. O

esclarecimento diagnóstico foi maior para DI severa, DI leve e hiperatividade associada a outros distúrbios. Os indivíduos testados apresentaram um total de 276 CNVs (187 microduplicações e 89 microdeleções); 81,2% benignas, 7,2% de significado incerto, 9,4% patogênicas e 2,2% potencialmente patogênicas. Os cromossomos 18, 19 e 21 apresentaram o menor número de CNVs. Não foi encontrada nenhuma CNV rara nos cromossomos 5, 10, 12, 19, 21 e Y. Seis casos potencialmente patogênicos foram descritos em mais detalhe, um desses casos representa uma deleção em 3 p13-p14.1 de 1.9MB, que confirma que a haploinsuficiência do gene MITF é suficiente para causar surdez congênita. Este estudo vem destacar a importância do CGH *array* para o diagnóstico de distúrbios do desenvolvimento inclusive para que seja inserido nos programas de saúde pública como um primeiro teste diagnóstico a ser ofertado pelo SUS.

Palavras-chave: Deficiência intelectual, CGH *array*, CNVs, indicações clínicas, distúrbios do desenvolvimento.

ABSTRACT

BARETTO, N. CNVs analysis and clinical uses for individuals with intellectual deficiency and other development disorders diagnosed in array CGH. Florianópolis, 2015. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.

Intellectual disability (ID) is characterized by significant limitations in intellectual functioning and in adaptive behavior. It originates before the age of 18, and affects about 1-3% of the world population and about 1.37% of the Brazilian population (CENSO 2010). ID has different levels of severity: mild, moderate, severe or profound, depending on the degree of intellectual impairment combined with adaptive behaviour. The etiological causes of ID are varied and difficult to identify due to clinical and genetic heterogeneity. Among the genetic causes, copy number variation (CNV) of DNA stretches in the genome has been widely studied in developmental disorders. CNVs are commonly classified as benign (common CNVs), of uncertain clinical significance (rare), potentially pathogenic (rare), and pathogenic (rare). This study aims to evaluate the CNVs found in patients with ID and developmental disorders and classify them according to their contribution to the appearance of the phenotype. We analyzed 109 results for CGH array investigation to obtain the phenotype of each individual. We observed: (1) a higher prevalence of males in the population studied, (2) that the major phenotypes observed were developmental delay, dysmorphic face and head and ID, and (3) the higher diagnostic rates were obtained for individuals with severe ID, mild ID, and hyperactivity. An overall of 276 CNVs (187 microduplications and 89 microdeletions) were observed. Of

these changes 81.2% were benign, 7.2% of uncertain significance, 2.2% potentially pathogenic and 9.4% pathogenic. Chromosomes 18, 19 and 21 had the lowest number of CNVs. Rare CNVs were not observed in chromosomes 5, 10, 12, 19, 21 and Y. Six cases of potentially pathogenic CNVs were studied in more detail, and in one of these cases a deletion of 1.9MB in 3p13-p14.1 was observed, confirming that the haploinsufficiency of the MITF gene is sufficient to cause congenital deafness. This study highlights the importance of the investigation of CNVs in the diagnosis of developmental disorders, underscoring the importance to include array CGH as first investigation for ID in the public health system (SUS).

Keywords: Intellectual Disability, array CGH, CNV, clinical indications, developmental disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAIDD: Associação Americana de Deficiência Intelectual e do Desenvolvimento (*American Association of Intellectual and Developmental Disabilities*);

ADNPM: Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor;

ANKRD: *Ankyrin Repeat Domain*;

BAC: Cromossomos Artificiais Bacterianos (*Bacterial Artificial Chromosomes*);

bHLHZip: zíper de leucina hélice-alça-hélix básico;

BIRC: *Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing*;

BMP: Proteína Morfogenética Óssea (*Bone Morphogenetic Proteins*);

CAGdb: *Cytogenomics Array Group CNV Database*;

CGH array: Hibridização Genômica Comparativa por microchip (*array Comparative Genomic Hybridization*);

ChAS: *Chromosome Analysis Suite*;

CHMP4C: *Charged Multivesicular body Protein 4C*;

CID: Classificação Internacional de Doenças;

CNV: Variações do Número de Cópias (*Copy Number Variation*);

CREBBP: *Creb-Binding Protein*;

DECIPHER: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*;

DGV: Banco de Dados de Variantes Genômicas (*Database of Genomic Variants*);

DI: Deficiência Intelectual;

DIL: Deficiência Intelectual Leve;

DIM: Deficiência Intelectual Moderada;

DIP: Deficiência Intelectual Profunda;

DIS: Deficiência Intelectual Severa;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico;

DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*);

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*);

EGF: Fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*);

ESCRT: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*;

FCEE: Fundação Catarinense de Educação Especial;

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridization*);

FMRI: X Frágil Retardo Mental (*Fragile X Mental Retardation 1*);

GABA: Ácido gama-aminobutírico (*Gamma-aminobutyric acid*);

GABRR: receptor rho de GABA;

GRCh: Consórcio Genoma Referência (*Genome Reference Consortium*);

Hg: Genoma Humano (*Human Genome*);

HIJG: Hospital Infantil Joana de Gusmão;

IAP: Inibidor de Apoptose (*Inhibitor of Apoptosis*);

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IMPA: Monofosfatase de mio-inositol (*Myo-inositol monophosphatase*);

ISCA: *International Standards for Cytogenomic Arrays*;

Kb: Kilo base (mil bases);

LOH: Perda de Heterozigose (*Loss of Heterozygosity*);

Mb: Mega base (milhões de bases);

MITF: Fator de Transcrição associado a Microftalmia (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*);

MLPA: *Multiplex ligation dependent probe amplification*;

NCBI: Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information);

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*;

PC: Paralisia Cerebral;

PCP: Polaridade Celular Planar;

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase;

PMP: Proteína mielina periférica;

PubMed: US National Library of Medicine National Institutes of Health;

QI: Quociente de Inteligência;

RNA: Ácido ribonucleico;
RNAm: RNA mensageiro;
SC: Santa Catarina;
SHOX: *Short Stature Homeobox*;
SMYD3: *Set and Mynd Domain-containing protein 3*;
SNP: Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism*);
SNX: *Sorting Nexin*;
ST: Síndrome de Tietz;
SUS: Sistema Único de Saúde;
SW: Síndrome de Waardenburg;
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
UCSC: Universidade da Califórnia Santa Cruz (*University of California Santa Cruz*);
UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo;
VOUS: Variantes de Significado Clínico Incerto (*Variants of Uncertain clinical Significance*);

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Percentual de classificação dos indivíduos de acordo com o sexo. 61
- Gráfico 2:** Número de indivíduos que apresentam uma, duas, três, quatro ou mais alterações e suas respectivas porcentagens. 64
- Gráfico 3:** Percentual de DGVs e CNVs raras encontradas nos exames de CGH *array*..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e Porcentagem dos principais fenótipos apresentados pelos 109 indivíduos com indicação clínica para realização do exame de CGH <i>array</i>	62
Tabela 2 – Número e Porcentagem de indivíduos do sexo masculino e feminino em relação a cada fenótipo listado	63
Tabela 3 - Número de CNVs totais e raras, duplicações e deleções por cromossomos.....	67
Tabela 4 - Número e percentual de CNVs totais e CNVs raras encontradas por cromossomo	68
Tabela 5 – Alterações cromossômicas raras encontradas através do exame de CGH <i>array</i>	71
Tabela 6 – CNVs patogênicas encontradas através do exame de CGH <i>array</i>	73
Tabela 7 – CNVs potencialmente patogênicas encontradas através do exame de CGH <i>array</i>	77
Tabela 8 – CNVs de significado incerto encontradas através do exame de CGH <i>array</i>	78
Tabela 9 – Porcentagem dos diagnósticos obtidos com relação aos fenótipos.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral do banco de dados UCSC *Genome Browser*. 59

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1 A Deficiência Intelectual.....	33
1.1.1 A Prevalência da DI.....	34
1.1.2 A Deficiência Intelectual no Brasil.....	35
1.1.3 Diagnóstico e Avaliação.....	36
1.1.4 Importância e Impactos na Sociedade	38
1.1.5 Causas da DI.....	39
1.2 Métodos Diagnósticos	41
1.2.1 CGH <i>array</i>	43
1.2.2 As Plataformas de CGH <i>array</i>.....	45
1.2.3 Outras Aplicabilidades do CGH <i>array</i>.....	46
1.2.4 Taxa Diagnóstica por CGH <i>array</i> em Estudos com DI e Anomalias Congênitas.....	47
1.3 Variação do Número de Cópias (CNVs) e sua Interpretação.....	49
2. JUSTIFICATIVA.....	52
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos Específicos.....	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Considerações Éticas.....	53
4.2 Caracterização da Amostra	54
4.3 Coleta das Amostras e Obtenção dos Dados Brutos de CGH <i>array</i>	54

4.4 Coleta de Dados Clínicos.....	56
4.5 Análise dos Dados Brutos de CGH <i>array</i>	56
4.6 Análise dos Dados.....	57
5. RESULTADOS	60
5.1 Análise dos Exames de CHG <i>array</i>	60
5.2 Análise dos Fenótipos Apresentados pelos Indivíduos com Indicação Clínica para Realizar o Exame de CGH <i>array</i>	61
5.3 Análise das CNVs Encontradas	64
5.5 Análise das CNVs Encontradas por Cromossomo	65
5.6 Análise das CNVs Raras	68
5.7 Taxa de Diagnóstico e Relação dos Fenótipos com Diagnóstico	81
6. DISCUSSÃO	82
6.1 Análise dos Exames de CHG <i>array</i>	82
6.2 Análise dos Fenótipos Apresentados pelos Indivíduos com Indicação Clínica para Realizar o Exame de CGH <i>array</i>	83
6.4 Classificação das CNVs.....	88
6.5 Análise das CNVs Encontradas por Cromossomo	88
6.6 Análise das CNVs Raras	91
6.6.1 Caso 1: Indivíduo 13121.....	92
6.6.2 Caso 2: Indivíduo 1303.....	94
6.6.3 Caso 3: Indivíduo 1325.....	95
6.6.4 Casos 4 e 5: Indivíduos 1331 e 1332.....	98
6.6.5 Caso 6: Indivíduo 1340.....	99
6.7 Taxa Diagnóstica e Relação dos Fenótipos com Diagnóstico	100

7. CONCLUSÕES.....	104
8. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES	105
9. REFERÊNCIAS.....	107
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	120
ANEXO B - Termo de Consentimento	125
ANEXO C – Ficha Clínica.....	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Deficiência Intelectual

O conceito de deficiência intelectual (DI) vem se modificando ao longo do tempo. A caracterização DI, um dos mais prevalentes distúrbios do desenvolvimento, é dada por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, que envolve muitas habilidades sociais e práticas cotidianas (SCHALOCK et al., 2010). Segundo a Associação Americana de Deficiência Intelectual e Desenvolvimento (2013), (do inglês, *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities - AAIDD*) entende-se por funcionamento intelectual a capacidade mental geral, como aprendizado, raciocínio, e resolução de problemas. Enquanto que o comportamento adaptativo é o conjunto de habilidades conceituais, sociais e práticas que são aprendidas e realizadas por pessoas em suas vidas cotidianas. São estas habilidades de linguagem e alfabetização, habilidades interpessoais/sociais, e práticas de habilidades de atividades da vida diária (AAIDD, 2014).

A DI origina-se antes dos 18 anos de idade, caracterizando esta patologia como uma condição relacionada com o neurodesenvolvimento do indivíduo. Estudar a etiologia da DI é um desafio devido à sua elevada heterogeneidade clínica e genética (ROSELLÓ et al., 2014). A maioria das DIs é classificada como sendo de causas idiopáticas (ainda não conhecidas). Podem se dever a um defeito isolado, onde o prejuízo cognitivo representa a única manifestação da patologia, denominada inespecífica ou não-sindrômica, ou causar uma desordem com

dismorfologias evidentes ou fatores clínicos, radiológicos, metabólicos associados, onde vários sistemas em desenvolvimento são afetados o que seria a DI síndrome (CHELLY et. al, 2006).

1.1.1 A Prevalência da DI

A DI afeta cerca de 1 a 3% da população mundial (HARRIS, 2006), distribuída de maneira desigual com relação a países emergentes e países desenvolvidos (KARR, 2011). Estima-se que cerca de 85% dos afetados apresentam deficiência intelectual leve (DIL); os outros 15% dividem-se em deficiência intelectual moderada (DIM) e deficiência intelectual severa (DIS) (VAN BOKHOVEN, 2011).

A maior prevalência é observada em países de renda baixa e média, onde as taxas de pessoas com DI chegam a ser quase duas vezes maiores do que nos países de alta renda (MAULIK et. al, 2011). Isso é compreensível, uma vez que em países com poucos recursos, pode haver mais nascimentos de crianças com DI, devido à má nutrição materna pela escassez de alimentos nessas regiões, a falta de métodos adequados de triagem pré-natal (DAVE; SHETTY; MEHTA et. al, 2005), e infecções recorrentes que as gestantes podem vir a ter devido as más condições de saúde e higiene nessas regiões (MAULIK et. al, 2011).

1.1.2 A Deficiência Intelectual no Brasil

De acordo com Censo 2010 (IBGE, 2011) no Brasil há 45.606.048 pessoas com pelo menos um tipo de deficiência, seja ela visual, auditiva, motora ou intelectual dentre seus 190.755.799 habitantes, ou seja, um percentual de 23,91% da população total possui algum tipo de deficiência. Destes, 2.611.536 apresentam DI, o que corresponde a 1,37% da população brasileira e a cerca de 5,7% da população com deficiência. No estado de Santa Catarina foram registradas 71.956 pessoas com DI, sendo que as 219 escolas especiais do estado conseguem atender cerca de 16.800 alunos, segundo dados fornecidos pela Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE) referentes ao primeiro semestre de 2011.

Mesmo com estes números, a percepção dos profissionais de saúde em relação a relevância da DI como problema de saúde pública é muito pequena comparada com outras doenças (MORAES et al. 2006). Muitas síndromes que envolvem DI têm fenótipos muito característicos que são facilmente reconhecíveis, porém a falta de profissionais preparados pode levar a atraso desnecessário no diagnóstico, diagnósticos equivocados ou oportunidades perdidas para oferecer aconselhamento genético (BENJAMIN et al. 2013).

As medidas que vem sendo tomadas para diminuir a incidência de DI no Brasil são relacionadas com a ampliação da cobertura de consultas pré-natais, melhorias no atendimento à gestante, e realização de teste do pezinho para identificação dos principais problemas metabólicos cujo diagnóstico precoce pode evitar ou reduzir a ocorrência de sequelas.

Porém, é importante que haja uma atenção especial as famílias onde ocorre a transmissão hereditária de deficiência intelectual.

1.1.3 Diagnóstico e Avaliação

Uma maneira de medir o funcionamento intelectual é através do teste de Quociente de Inteligência (QI), sendo este um critério para diagnóstico e avaliação de DI amplamente utilizado no mundo inteiro (REJEB; JEMAA; CHAABOUNI, 2009). O QI é uma medida obtida por meio de testes desenvolvidos para avaliar as capacidades cognitivas do indivíduo, em comparação ao seu grupo etário. Geralmente, um teste de QI de cerca de 70 a 75 pontos indica um funcionamento intelectual limítrofe. Com base nos valores de QI, os níveis de gravidade de DI, segundo a Associação Americana de Psiquiatria, são avaliados em quatro tipos: DIL (QI entre 70 e 50), DIM (QI entre 49 e 35), DIS (QI entre 34 e 20) e DI profunda (QI inferior a 20) (DSM IV, 2010), esta última, em muitos estudos, costuma ser englobada dentro da DIS. No entanto, é importante ressaltar que outros fatores devem ser levados em conta, como o ambiente, a comunidade que este indivíduo está inserido e a sua diversidade (LEONARD; WEN, 2002).

Como muitas vezes não há possibilidade de se realizar um teste de QI por profissionais capacitados como psicólogos ou psicopedagogos, muitos médicos com base na experiência profissional conseguem classificar seus pacientes de acordo com dados clínicos obtidos na consulta, de acordo com o que é proposto pela nova versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais publicada em 2013 (DSM-V). Nesta versão as pontuações de QI foram desconsideradas, pois

não existe mais um limiar para se estabelecer um diagnóstico. A justificativa para esta mudança foi que as pontuações de QI podem ser insuficientes para avaliar o raciocínio em situações da vida real e domínio das tarefas práticas e sociais. Por exemplo, uma pessoa com um QI acima de 70 pode ter graves problemas de comportamento adaptativo e na compreensão social, sendo seu funcionamento real comparável à de indivíduos com uma pontuação de QI mais baixo ou vice-versa (DSM-V 2013).

Quanto mais grave a deficiência intelectual, maior a chance de haver a presença associada de crises convulsivas, autismo e problemas na coordenação (JELLIFFE-PAWLOWSKI et al., 2003). De acordo com o DSM-V (2013) a DIL é geralmente atribuída a indivíduos que não se beneficiam da instrução que recebem para um maior desempenho na sua vida acadêmica e laboral, com falhas na compreensão ou exposição de conceitos abstratos, com atenção oscilante, porém com boa autonomia nas atividades da vida diária (alimentar-se, realizar medidas de cuidado e higiene pessoal, deslocar-se dentro e fora do domicílio e tomar decisões).

Os indivíduos com DIM, além de problemas com atenção, são caracterizados por um fluxo lento de ideias, pobreza de associações, dificuldade para abstração ou síntese de ideias, dificuldades para compreensão de conceitos relativamente simples, comportamento variável/instável, falhas de percepção, problemas de coordenação motora e semi-dependência nas atividades cotidianas (DSM-5, 2013).

Os indivíduos com DIS têm falhas sérias na comunicação, utilizando palavras simples e frases pouco elaboradas, apresentam déficits no desenvolvimento psicomotor com alteração no padrão de marcha e necessitam de supervisão 24 horas por dia, com necessidade de auxílio

para várias atividades simples de autocuidado. Os indivíduos com DI profunda estariam abaixo das possibilidades da testagem de QI por pontuação, apresentando graves déficits na fala e linguagem, com comunicação eventual por meio de fala estereotipada e rudimentar de difícil compreensão, déficits psicomotores graves, geralmente com incapacidade para locomoção, podendo apresentar comportamentos autodestrutivos, como bater a cabeça na parede ou automutilação, necessitando de auxílio mesmo para as necessidades mais básicas (DSM-V, 2013).

O diagnóstico de DI não deve ser feito antes dos 5 anos, pois seria um diagnóstico inconclusivo, uma vez que os instrumentos válidos disponíveis para avaliar a inteligência não são geralmente aplicáveis nesta fase. Assim, para esses casos, adota-se o termo Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM), pois ainda se considera a possibilidade de ser um atraso que pode ser recuperado (SHAFFER, 2005). Depois de estabelecida a DI, não há formas de reverter a situação.

1.1.4 Importância e Impactos na Sociedade

A DI é a condição mais cara de todos os diagnósticos da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), mais cara que a neoplasia, conhecidamente a doença que mais mata no mundo (ROPERS, 2010). Este custo é calculado pela manutenção básica do indivíduo com alimentação, vestuário, cuidados com saúde e educação, como também pela força de trabalho perdida por este indivíduo afetado, assim como o custo do trabalho de quem cuida do mesmo (BOKHOVEN, 2011).

Seus impactos na sociedade fazem com que a DI ainda não tenha uma interpretação ligada como uma condição de saúde, mas principalmente como uma questão social ou educacional. A DI é muitas vezes esquecida por causa de sua associação com outros transtornos psiquiátricos, como o autismo, epilepsia e esquizofrenia, fato que também contribui para que não esteja presente em diversos programas globais de saúde. Mesmo em cursos de medicina, praticamente não há ensino direcionado ao diagnóstico e atenção do indivíduo com DI.

1.1.5 Causas da DI

As causas etiológicas da DI são variadas e de difícil identificação. Os fatores incidentes podem ser de origem genética que incluem anormalidades cromossômicas, síndromes de microduplicação ou microdeleção; formas ligadas ao cromossomo X; autossômicas monogênicas de herança dominante ou recessiva, podendo ser impactadas por *imprinting* genético (ROSELLÓ et al., 2014). Dentre as herdadas, a consanguinidade é considerada um importante fator de risco.

A DI também pode ser derivada de causas ambientais que afetam o complexo materno-fetal como tabagismo, alcoolismo, consumo de drogas, efeitos colaterais de medicamentos teratogênicos, doenças maternas crônicas ou gestacionais, doenças infecciosas na mãe que podem comprometer o feto, e desnutrição materna (ROPERS, 2010; FIOCRUZ, 2014). Depois há outros fatores como hipóxia ou anóxia perinatal, prematuridade e baixo peso, icterícia grave do recém-nascido, desnutrição, desidratação grave, carência de estimulação global, infecções (meningites, sarampo, rubéola, toxoplasmose,

citomegalovírus), intoxicações exógenas e acidentes que acarretem traumas cerebrais, que podem prejudicar o desenvolvimento intelectual normal resultando em DI (ARMATAS, 2009).

Segundo Robinson e Linden (1993) as malformações congênicas que acometem cerca de 3 a 4% dos recém nascidos e até 6% considerando crianças de no máximo um ano de idade, aumentam mais de 20 vezes a probabilidade de uma criança apresentar DI até os 7 anos de vida, comparando-se com crianças da mesma idade sem malformações aparentes (JELLIFFE-PAWLOWSKI et al., 2003).

Anomalias cromossômicas são detectadas nos exames de indivíduos com deficiência intelectual em porcentagens que variam entre 4% a 34.1% (XU; CHEN, 2003). Sabe-se ainda que muitos casos de deficiência intelectual abrangem rearranjos cromossômicos subtelo méricos, provavelmente devido à alta densidade de genes nestas regiões (DE VRIES, et. al, 2003). Estes rearranjos explicam a causa de pelo menos 5% dos casos de deficiência intelectual idiopática e são observados em casos de DIM com uma taxa de 7,4%. (DE VRIES et al., 2001; RAUCH et al., 2004).

Principalmente, na DIM e DIS os fatores genéticos são as causas mais importantes (BALASUBRAMANIAN; BHATT; GOYEL, 2009). Mais de 60% da DIS ($QI \leq 50$) pode ser causada por fatores genéticos (INLOW; RESTIFO, 2004; TURNPENNY; ELLARD, 2009).

Nas populações caucasianas, uma porção significativa dos casos ocorre devido a mutações dominantes novas, incluindo microdeleções e microduplicações. Em casos de deficiência intelectual esporádica, estas alterações, assim como translocações e inversões, representam cerca de 10-15% dos casos (BISSAR-TADMOURI et al., 2014).

Algumas condições dominantes podem ser herdadas, mas geralmente sua herança não segue um padrão estabelecido, uma vez que os genes causais devem ter expressividade variável ou penetrância incompleta para se perpetuar na população, o que reflete uma expressão influenciada pelo ambiente genômico em que se manifestam. (ACOSTA et al., 2012; GREENBERG et al., 2012; e MARIS; TROTT, 2011).

1.2 Métodos Diagnósticos

Para se encontrar alterações genéticas que possam ser causadoras de distúrbios do desenvolvimento foram desenvolvidas inúmeras técnicas. A primeira técnica capaz de observar tais alterações, foi a citogenética tradicional, onde se faz uma análise individual, célula a célula, do padrão cromossômico. Esta técnica detecta muitas translocações, grandes deleções e duplicações, porém não fornece informações diretas que identifiquem os genes associados às alterações encontradas. Com seu auxílio foram descobertas alterações cromossômicas responsáveis por síndromes com características clínicas bem conhecidas, como a Síndrome de Prader-Willi, Angelman e Williams, que posteriormente foram explicadas por haploinsuficiência ou *imprinting* de genes específicos (GOLDENBERG; SAUGIER-VEBER, 2010). Cerca de 10-20% dos casos de deficiência intelectual podem ser explicados por achados em exames de cariótipo alterados, com menor percentual (3%) na pesquisa de síndromes que não são identificadas na análise clínica (DETH, 2012; MILLER et al., 2010).

Métodos de citogenética molecular surgiram para serem complementares aos métodos de citogenética clássica. A técnica de

hibridação *in situ* fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridization-FISH*), detecta sequências de DNA com uma sonda marcada com fluorescência que hibridiza especificamente com a sua sequência alvo complementar, vindo suprir limitações da citogenética tradicional, possibilitando, assim, determinar regiões com maior especificidade (TRASK, 1991). Outra técnica muito utilizada é MLPA (*Multiplex ligation dependent probe amplification*), que permite detectar microdeleções e microduplicações com até 40 sequências de DNA, com base em reações de cadeia da polimerase (PCR) (SCHOUTEN et al., 2002). As duas técnicas contribuíram para a observação de alterações cromossômicas estruturais com tamanhos inferiores aos 10 milhões de bases (Mb), como as deleções subteloôméricas, que representam aproximadamente 2,5 a 5% de todos os indivíduos com diagnóstico de DI (DE VRIES et al., 2001; BOKHOVEN, 2011). Como essas duas técnicas utilizam sondas com locais de ligação no DNA específicos, para solicitar exames de diagnósticos por técnicas como FISH e MLPA deve-se suspeitar ou conhecer a patologia e/ou o local do genoma em que pode ser encontrada a alteração responsável, como ocorre nas síndromes de Prader-Willi e Angelman (15q11.2-q13) e síndrome de Williams-Beuren (7q11.23), entre muitas outras.

Novas técnicas surgiram para que pudesse ser feito o diagnóstico de indivíduos que não apresentam características evidentes de alguma síndrome conhecida, possuem DI idiopática e o exame de cariótipo não evidenciou alterações. Isso é a realidade da maioria dos casos devido a grande heterogeneidade etiológica da DI. Nesta situação é necessário partir para técnicas genômicas como hibridização genômica comparativa por microchip (*array Comparative Genomic Hybridization*) geralmente referida como CGH *array* (MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN,

2012), sequenciamento de nova geração de exoma ou mesmo do genoma completo. Estas investigações podem detectar aneuploidias e síndromes como a síndrome de Di George (22q11.2), a monossomia de 1p36.1, até mutações de ponto, regiões com perda de heterozigotidade e alterações no padrão de metilação. A aplicação das técnicas genômicas para o estudo de indivíduos com DI tem fornecido um grande avanço na compreensão da sua etiologia e caracterização de novas síndromes devido à sua maior resolução e precisão.

1.2.1 CGH *array*

A técnica da hibridização genômica comparativa foi descrita por Kallioniemi et al. (1992), envolvendo longos trechos cromossômicos dispostos em uma lâmina. Desta técnica derivou a hibridização genômica comparativa em microchip de DNA (*Array Comparative Genomic Hybridization*), conhecida por *CGH array*, *microarray* ou *aCGH*, onde trechos bem menores (sondas) eram utilizados. O *CGH array* surgiu como uma importante ferramenta para a detecção de alta resolução de variações do número de cópias (*copy number variation* - CNVs) de trechos de DNA no genoma, aprimorada através de matrizes que possuem uma maior densidade de sondas carregadas em chips, acompanhada pela evolução de tecnologias de detecção cada vez mais precisas e sofisticadas, o que permitiu que alterações muito menores fossem detectadas e um número maior de genes fossem testados (VASSON et. al, 2013).

A técnica de *CGH array* permite a análise do genoma com uma resolução tão alta quanto 1 quilo bases (Kb), mil bases, enquanto que o exame de citogenética convencional permite a uma resolução de 10 a 5

Mb (EVANGELIDOU et al., 2013; D'AMBROSIO et al., 2014). No momento, essa técnica é considerada o melhor método para detectar desequilíbrios genômicos, em particular rearranjos submicroscópicos, perdas (microdeleções) e ganhos (microduplicações) de DNA, assim como perdas de heterozigose (*Loss of Heterozygosity* - LOH). LOH representa áreas do genoma que possuem longos trechos contínuos de homozigose, frequentes em indivíduos aparentados, ajudando a detectar o aumento de risco para uma condição recessiva ou sugerir uma dissomia uniparental, assim como pode identificar grandes rearranjos intragênicos.

O CGH *array* apresenta a desvantagem de não detectar rearranjos equilibrados como inserções, translocações e inversões nas quais não ocorreu ganho ou perda de DNA, mas que as vezes podem afetar a estrutura ou a expressão de genes, e não consegue detectar mutações pontuais responsáveis por doenças monogênicas. Mas é possível customizar o chip para reconhecer polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) específicos (VASSON et al., 2013; D'AMBROSIO et al., 2014).

Nos resultados dessa técnica é possível observar a região exata da alteração, pela coordenada genômica, e também o tamanho da CNV encontrada. É possível verificar nos segmentos cromossômicos de um indivíduo se há alteração (deleção ou duplicação) de DNA comparado ao genoma referência. Os programas utilizados para analisar as CNVs permitem identificar se existem genes envolvidos na alteração, e quais são, através de correlação com a sequência referência do genoma humano (KHARBANDA; TOLMIE; JOSS, 2014).

A possibilidade de análise simultânea de todos os genes do genoma torna o CGH *array* uma ferramenta valiosa para uma nova

abordagem de diagnóstico que vem para facilitar o diagnóstico molecular de grupos heterogêneos de doenças, tais como as distrofias musculares, DI e autismo (VASSON et al., 2013).

Geralmente a amostra em investigação e uma amostra referência são marcadas diferencialmente com fluorocromos (verde e vermelho) depois co-hibridizadas no chip (*array*). O software de análise de matriz CGH usa algoritmos para identificar deleções e duplicações na amostra investigada, com base na diferença de densidade das cores em cada ponto da matriz. Excesso de vermelho indica deleção no DNA do analisado e excesso de verde indica uma duplicação desse DNA (KHARBANDA; TOLMIE; JOSS, 2014). Porém há inovações neste sistema. Na metodologia de CGH *array* da Affymetrix (utilizada no presente estudo) as sequências de DNA do indivíduo afetado são comparadas com sondas de DNA de sequências referência depositados na plataforma de *microarray*, sendo as diferenças de hibridização detectadas diretamente, dispensando a competição de hibridização com uma amostra referência (AFFYMETRIX, 2013).

1.2.2 As Plataformas de CGH *array*

As plataformas variam basicamente de acordo com a resolução e o tipo das sondas que compõem o chip (SHINAWI; CHEUNG, 2008). A resolução é mensurada pelo tamanho e o espaçamento entre uma sonda e outra. Os tipos de sondas podem ser: sondas em BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) ou oligonucleotídeos. As sondas de BACs derivam de bancos genômicos de sequências humanas inseridas em cromossomos bacterianos artificiais e possuem uma resolução mais baixa quando

comparadas às plataformas de oligonucleotídeos. Microchips de oligonucleotídeos são comumente usados pela maioria dos laboratórios pois possuem um aumento da cobertura genômica para quase três milhões de sondas por matriz (BOKHOVEN, 2011).

As plataformas compostas por oligonucleotídeos possuem capacidade diagnóstica mais elevada (~15%) que as compostas por BACs (~10%), fornecendo uma maior gama de elementos para o aconselhamento genético (CARLSON et al., 2005; ROGOWSKI, 2006). As principais companhias que trabalham com as plataformas de oligonucleotídeos comerciais são: Agilent, Affymetrix, NimbleGen e Illumina, cada qual com suas vantagens, que dependem também do objetivo (clínico ou pesquisa), da expertise disponível para a interpretação dos dados obtidos. É importante ressaltar que há um constante melhoramento na resolução das plataformas que tendem a um grau de definição cada vez maior conforme aumentam a densidade de sondas e acréscimo de polimorfismos e a precisão dos *scanners* que realizam a leitura da hibridização.

1.2.3 Outras Aplicabilidades do CGH *array*

O CGH *array* permite ajudar na identificação de possíveis genes relacionados ao câncer, devido as descobertas recorrentes de segmentos cromossômicos amplificados, pequenas deleções de genes supressores de tumor e deleções ou rearranjos de genes sensíveis à dosagem, os chamados proto-oncogenes (KALLIONIEMI, 2008). Forneceu importantes subsídios para o entendimento de mecanismos e etiologia desta patologia, e que podem direcionar os tratamentos (CLIMENT et al.,

2007; MOHAPATRA et al., 2013). Matrizes que contêm sondas polimórficas específicas têm sido amplamente utilizadas para a cariotipagem molecular de diversos tipos de neoplasias hematológicas (SIMONS et al., 2012).

O CGH *array* vem se mostrando um teste sensível e válido para detectar todas as anomalias observadas em cariótipo e em revelar rearranjos submicroscópicos em fetos em concepção, sendo uma importante alternativa para o diagnóstico pré-natal (SHAEFFER et al., 2005). Alterações patológicas foram encontradas em 10,9% de 64 exames pré-natais realizados (EVANGELIDOU et al., 2013), enquanto outro estudo que preconiza somente considerar alterações maiores que 3Mb relatou alterações patogênicas em 6,7% de 342 exames pré natais (AHN et al., 2014).

No diagnóstico pré-implantacional também observa-se a eficiência do CGH *array* devido a sua precisão diagnóstica, mesmo sendo realizado em amostras de 4 a 6 células, identificando CNVs patogênicas aneuploidias e euploidias, tendo permitido aumentar as taxas de gestação de 20% para 60% dependendo da indicação do tratamento e da idade da paciente (CHANG et al., 2011, FIORENTINO et al., 2014).

1.2.4 Taxa Diagnóstica por CGH *array* em Estudos com DI e Anomalias Congênicas

O CGH *array* demonstra um rendimento diagnóstico bastante alto em crianças com deficiência intelectual idiopática e múltiplas anomalias congênicas, pois detecta desequilíbrios genômicos em 10-15% dos casos, apesar do cariótipo apresentar-se normal (STANKIEWICZ;

BEAUEDT, 2007) e até 33% dos casos quando é utilizado como primeira técnica diagnóstica (BARTNIK, et al., 20014).

As análises de regiões subteloméricas em indivíduos com DI e características dismórficas usando FISH, identificam anormalidades cromossômicas em apenas 5-6% (FLINT; KNIGHT, 2003). Um estudo que analisou a aplicação de múltiplas técnicas de diagnóstico genético de complexidade crescente, verificou uma taxa geral de detecção de anormalidades genômicas em crianças com anomalias congênitas múltiplas e/ou DI de 12-18%, sendo 3-5% detectado pelo cariótipo, 5-6% adicionais detectados por FISH, somados a 4-7% detectado pelo CGH *array* (STANKIEWICZ; BEAUEDT, 2007). Em gestações com anomalias detectadas pelo exame de ultrassom a taxa de diagnóstico por CGH *array* é 5,2% mais elevada que o cariótipo convencional (HILLMAN, et al. 2011).

Disparidades registradas entre as taxas de diagnóstico ocorrem pelo uso de diferentes plataformas de CGH *array*, cada uma com seu limite de eficiência, sendo que a resolução tem aumentado drasticamente em poucos anos. Mas também pode ser influenciada pelos critérios clínicos para solicitação dos exames de CGH *array* não estarem muito bem esclarecidos na comunidade médica para que indivíduos com maior probabilidade de CNVs causais preferencialmente sejam testados através do exame de CGH *array* (SHOUKIER et al. 2013). Além disso, a interpretação dos exames requer um aumento do conhecimento dos pesquisadores e da capacidade dos laboratórios para uma melhor análise dos resultados (VETRO et al., 2012).

1.3 Variação do Número de Cópias (CNVs) e sua Interpretação

As CNVs são muito abundantes no genoma humano, sendo envolvidas na variação genética entre as populações de uma forma semelhante aos SNPs. Sabe-se que as CNVs, também influenciam as variações genéticas e a susceptibilidade à doença (IAFRATE et al., 2004; CRONIN et al., 2008).

Alterações no número de cópias podem variar em tamanho de kilobases (Kb) a megabases (Mb) ou até mesmo representar cromossomos inteiros (trissomias e monossomias) e podem envolver genes em diferentes proporções. Em uma revisão publicada na revista científica *Nature*, Feuk, Carson e Scherer (2006) definem as alterações que variam de 1kb a 3 Mb de tamanho, como variantes estruturais submicroscópicas.

As deleções podem ser heterozigóticas, em que uma das duas cópias usuais está ausente, homozigóticas, em que ambas as cópias estão em falta, ou hemizigóticas quando a única cópia presente está em falta (por exemplo, deleções nos cromossomos X ou Y de um indivíduo do sexo masculino). As duplicações muitas vezes resultam em três cópias, sendo que usualmente se tem apenas duas (MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012). A interpretação das microduplicações é ainda mais difícil que das microdeleções (STANKIEWICZ; PURSLEY; CHEUNG, 2010).

Com a aplicabilidade da técnica do CGH *array*, a detecção de CNVs, aumentou tanto em indivíduos afetados por alguma patologia como também em pessoas saudáveis. Há, no entanto, evidências que sugerem que mesmo tais alterações “polimórficas” podem ter relevância

funcional, ou seja, algumas CNVs comuns têm sido associadas a traços fenotípicos específicos e predisposição para desenvolver certas doenças (SHOICHET et al., 2009).

A maior dificuldade que os pesquisadores encontram é com relação a interpretação do significado clínico dessas CNVs, que pode ser melhor estabelecido se essas alterações estão localizadas dentro de genes ou regiões reguladoras, uma vez que a possível consequência do desequilíbrio pode ser mais facilmente interpretada (FERLINI et al., 2010).

De acordo com Gijbers, Schoumans e Ruivenkamp (2011) as CNVs podem ser classificadas como benignas (CNVs comuns), potencialmente patogênicas (raras) ou conhecidamente patogênicas (raras). Recente publicação sugere uma quarta classificação: significado clínico desconhecido ou incerto, também raras (BARTNIK et al., 2014). A maneira mais confiável de determinar a relevância clínica de uma CNV para um indivíduo é compará-la com CNVs reunidas em grandes bancos de dados (VETRO et al., 2012). Nesse sentido, muitas pesquisas estão sendo realizadas sobre o tema e vários trabalhos estão sendo propostos por laboratórios que fornecem diagnósticos, inclusive sobre como realizar a consulta em bancos de dados com o intuito de ajudar a atribuir significados às CNVs.

As CNVs benignas aparecem em 6% do genoma humano e se considera que não têm significado para o fenótipo do indivíduo. No genoma há genes que possuem ampla variedade com relação ao seu tamanho e número de repetições, podendo apresentar um maior número de cópias em indivíduos com um quadro clínico considerado normal, e muitas vezes essas CNVs acabam dificultando a interpretação dos

resultados encontrados no CGH *array* (SHAIKH et al., 2009). As de significado clínico incerto não são observadas na população normal e possuem genes de função pouco conhecida ou RNA não codificante, e sua interpretação ainda é um desafio para os pesquisadores (D'AMBROSIO et al., 2014).

Nas CNVs com potencial patogênico são observados genes relevantes na região alterada que ainda não possuem relação com síndromes conhecidas, e não são encontradas em grande número na população. Para correlacionar as variações do número de cópias com fenótipos dos indivíduos, alguns critérios (tamanho, número de genes) são consultados e análises de informações que constam em bancos de dados são verificadas (BEJJANI; SHAFFER, 2009; LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007). As CNVs conhecidamente patogênicas estão descritas nos bancos de dados e na literatura com causadoras de síndromes bem caracterizadas, suas regiões contêm genes associados à doença ou regiões subteloméricas conhecidamente ricas em genes.

A crescente quantidade de informações coletadas pelos diferentes bancos de dados, permitirá estabelecer relação entre determinada CNV e uma possível condição patogênica com precisão crescente (D'AMBROSIO, 2014). A caracterização clínica dos indivíduos é de extrema importância para a utilização desses bancos de dados (VETRO et al., 2012).

Muitas CNVs que não possuem um significado patológico penetrante e bem estabelecido podem ser herdadas. É válido, nestes casos, aplicar o teste fenotípico aos pais biológicos, o que permite verificar se a alteração foi herdada de um genitor assintomático (CHEUNG et al.,

2007). Se for o caso, é menos provável que a alteração seja a causa do problema apresentado pelo indivíduo.

2. JUSTIFICATIVA

O crescente avanço em descobertas de CNVs causadoras de distúrbios do desenvolvimento faz com que grupos que estudam deficiência intelectual e outros distúrbios voltem sua atenção para os achados nos exames de CGH *array*. Apesar de ter sido amplamente adotada, esta ainda é uma técnica incipiente, onde a investigação está em processo de conhecer a variação normal para distinguir da patogênica. Novas alterações vêm sendo descritas continuamente, sendo este um bom momento para participar deste processo, pois há boa possibilidade para contribuições relevantes, principalmente na identificação de novos genes cuja alteração possa estar envolvida em distúrbios do desenvolvimento.

Ademais, ainda não há informações publicadas sobre como o CGH *array* têm auxiliado no diagnóstico de DI e outros distúrbios do desenvolvimento no Estado de SC, ou se a taxa diagnóstica é comparável àquela obtida em outros países, ou quais são as principais indicações para o exame no Estado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações do número de cópias do genoma presentes em indivíduos com distúrbios do desenvolvimento e entender a sua contribuição para o aparecimento do fenótipo.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar as principais indicações clínicas que levaram aos médicos a solicitarem o exame de CGH *array*;
- Analisar as CNVs encontradas no grupo de indivíduos investigados de acordo com seu tipo, localização, tamanho, genes presentes, presença na população e estimar o seu potencial patogênico.
- Verificar se há correlação de determinados fenótipos com uma maior probabilidade de diagnóstico por CGH *array*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

O presente trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) e obteve aprovação sob o número: 015/2013 (ANEXO A).

4.2 Caracterização da Amostra

A amostra foi composta de 109 dos 150 resultados de exames de CGH *array*, de indivíduos com DI ou outros distúrbios do desenvolvimento, solicitados ao Laboratório de Genética Humana Neurogene. As solicitações foram feitas por médicos neuropediatras e geneticistas do HJG e de clínicas particulares, no período de dezembro de 2012 à dezembro de 2013, através de convênios do Sistema Único de Saúde (SUS), Unimed, interlaboratoriais ou particulares. Dos 150 exames solicitados ao laboratório citado, 17 indivíduos não quiseram participar e 24 apresentaram como única alteração a perda de heterozigose (LOH). Neste trabalho optou-se por não analisar os resultados referentes a LOH, devido a incerteza que envolve este resultado, uma vez que necessita a realização de outros testes moleculares (sequenciamento gênico, principalmente), para confirmar a maioria das hipóteses geralmente relacionadas a presença de mutação pontual recessiva em algum gene crítico da região homozigota.

4.3 Coleta das Amostras e Obtenção dos Dados Brutos de CGH *array*

As amostras com 10 ml de sangue periférico para a realização do CGH *array* foram coletadas pela equipe do Laboratório Neurogene, depositadas em tubos com ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - EDTA) e devidamente identificadas. Uma vez que Santa Catarina não possui a tecnologia para a realização do exame, as mesmas foram encaminhadas para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com a qual o laboratório possui convênio, onde

foram processadas através da plataforma Affymetrix CytoScan® HD. Esta plataforma possui excelente especificidade, sensibilidade e alta resolução.

Em seguida, os dados brutos foram devolvidos em arquivos no formato BED ao Laboratório Neurogene, onde foram analisados através do programa *Chromosome Analysis Suite* (ChAS), que consegue ler os arquivos e identificar todas as alterações presentes, com uma resolução de 200 Kpb para ganhos e 150 Kpb para perdas genômicas. A posição genômica linear é dada relativa ao Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI), com base no Consórcio Genoma Referência (*Genome Reference Consortium* - GRCh37) do genoma humano (versão *Human Genome* - hg19 build 37) de Fevereiro de 2009 (GRCh37/hg19).

Os resultados dos exames (todas as alterações encontradas (deleções/duplicações), coordenadas genômicas, tamanhos e regiões) para este trabalho foram fornecidos pelo Laboratório Neurogene de forma sigilosa e sem o resultado da análise pelo laboratório, não comprometendo a identidade do paciente. Os indivíduos foram identificados através de um código, contendo a indicação clínica pela qual foi solicitado o exame, o nome do médico solicitante e o resultado do mesmo. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) e questionários prévios foram entregues aos pais/responsáveis dos indivíduos, sendo preenchidos e devidamente assinados.

4.4 Coleta de Dados Clínicos

Entrou-se em contato com os médicos solicitantes do exame de CGH *array* para verificar sobre sua disposição de participar deste trabalho. A participação destes foi informar, a partir do prontuário, detalhes clínicos dos indivíduos que realizaram os exames de CGH *array*, complementando as indicações pelas quais os indivíduos foram encaminhados ao exame.

A identidade dos indivíduos foi mantida anônima durante todo o trabalho, apenas o Laboratório responsável e os médicos tinham acesso a esta informação. A pesquisadora fornecia ao médico o código do paciente, referente ao exame em questão e, em entrevista, o médico respondia as informações necessárias para preenchimento da ficha clínica (ANEXO C) consultando o prontuário. Dados clínicos como grau de comprometimento intelectual, presença/ausência de dismorfias, presença/ausência de malformações, além de outras particularidades clínicas, foram assim coletadas.

4.5 Análise dos Dados Brutos de CGH *array*

Foram analisados os exames de CGH *array* do Laboratório Neurogene que tinham alterações de microduplicações ou microdeleções. Foi realizada análise das CNVs presentes em diferentes bancos de dados disponíveis na internet, e pesquisa dos genes envolvidos na literatura para entender a função dos mesmos. Pesquisou-se dados sobre sensibilidade a dosagem (superexpressão, haploinsuficiência), sobre se mutações em algum gene envolvido foram previamente relacionados a patologias

humanas, entre outras, com a finalidade de verificar uma relação causal conhecida ou possível entre a alteração encontrada e o fenótipo do paciente.

Variações no número de cópias de sequências de DNA que são encontradas comumente na população, e registradas no banco de dados de variantes genômicas (do inglês, *Database of Genomic Variants* - DGVs), não foram consideradas como causais.

4.6 Análise dos Dados

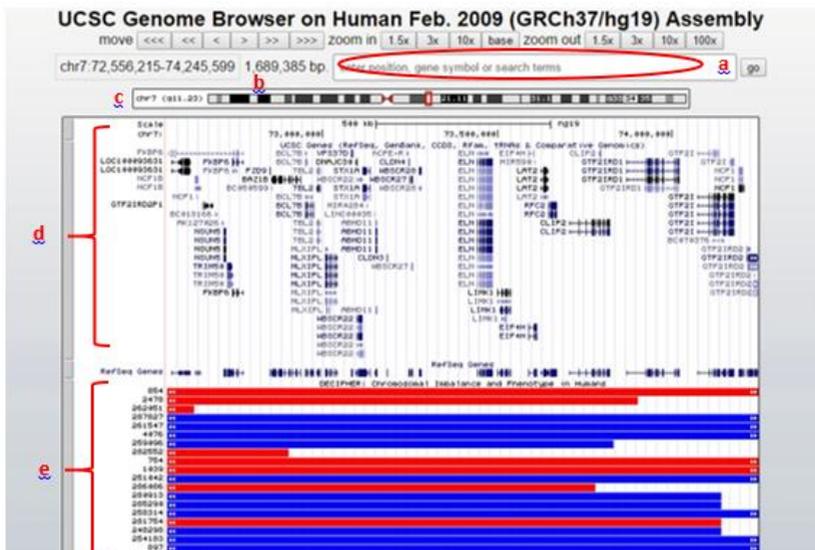
Os dados foram tabulados em planilhas EXCEL (Microsoft Office), para comparação, obtenção das frequências em porcentagem e elaboração de gráficos.

Para análise dos dados, foram usados os bancos de dados de variantes genômicas (DGVs) - (<http://projects.tcag.ca/variation/>), que reúne dados de artigos científicos, e lista CNVs que foram encontradas apenas em indivíduos controles. Além deste, foram consultados: *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>); *International Standards for Cytogenomic Arrays* (ISCA) - (<https://www.iscaconsortium.org>); *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) - (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>); *Cytogenomics Array Group CNV Database* (CAGdb) - (<http://cagdb.org>); e *University of California Santa Cruz Genome Browser* (UCSC Genome Browser) - (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Estes bancos, reúnem

dados de todas as CNVs patogênicas encontradas em indivíduos do mundo todo, incluindo distúrbios do desenvolvimento.

A análise das alterações foi feita da seguinte forma: no banco de dados UCSC *Genome Browser*, foram inseridas as coordenadas da região alterada, como é possível visualizar na Figura 1. Com este banco de dados é possível confirmar o tamanho da alteração e os genes envolvidos e tem-se acesso a bancos de dados correlacionados (citados acima). Assim pode ser verificado se a alteração foi descrita como patogênica e informações sobre o fenótipo do indivíduo (DECIPHER, ISCA), se é considerada como variante benigna (DGV), se os genes encontrados possuem alguma relação com doenças genéticas conhecidas (OMIM) e se a alteração está sendo observada em outros laboratórios de pesquisa (CAGdb). Em seguida, as alterações não conhecidamente patogênicas são analisadas com apoio na literatura, geralmente obtida através de pesquisa no Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), no sentido de verificar informações sobre a região e/ou genes envolvidos.

Figura 1: Visão geral do banco de dados UCSC *Genome Browser* disponível em: (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) a: indicação para inserção da coordenada genômica; b: tamanho da região que compreende a CNV; c: posição da CNV no cromossomo; d: resumo dos genes envolvidos na alteração e e: resumo de dados que constam em outros bancos.



Assim é possível pesquisar se as alterações encontradas no exame de CGH *array*, somadas às características fenotípicas, foram descritas (ou não) em qualquer parte do mundo, e ainda, se são síndromes bem validadas e conhecidas (ou não). Após esta análise, as alterações encontradas foram classificadas em: CNVs benignas/polimorfismos (DGVs); CNVs patogênicas; CNVs potencialmente patogênicas; identificadas desta forma por possuírem genes relevantes, porém ainda não confirmadas na literatura como patogênicas e CNVs de significado incerto, onde são consideradas as alterações que até o momento não foram

descritas como polimorfismos em pessoas não afetadas, porém contêm genes de função pouco conhecida ou RNA não codificante, o que não possibilita desconsiderar um possível papel causal na patologia do indivíduo.

Para fazer esta classificação é levado em consideração o tamanho da CNV, se é um ganho (microduplicação) ou uma perda (microdeleção), os genes presentes na região, se a alteração se encontra no banco de dados de alterações normais (DGV), se há relatos desta alteração em bancos que registram CNVs patogênicas (ISCA, DECIPHER, CAGdb), dados clínicos e o fenótipo do paciente.

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos Exames de CHG *array*

A análise de CNVs foi feita para 109 indivíduos; 37 do sexo feminino e 72 do sexo masculino (Gráfico 1), provenientes de diversos locais do país distribuídos principalmente pela região sul do Brasil, em especial no estado de Santa Catarina. Destes, 40 indivíduos tinham idade igual ou inferior a 5 anos de idade.

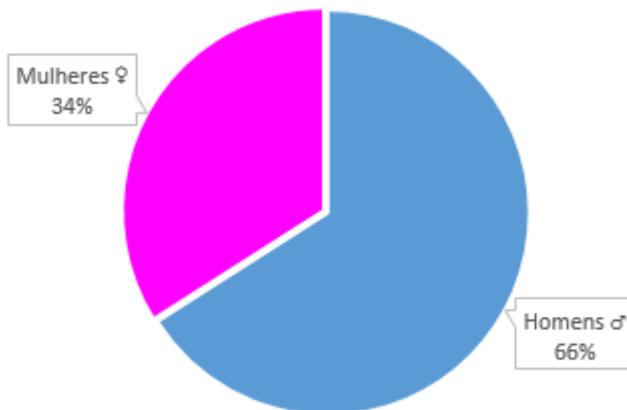


Gráfico 1: Percentual de classificação dos indivíduos de acordo com o sexo.

5.2 Análise dos Fenótipos Apresentados pelos Indivíduos com Indicação Clínica para Realizar o Exame de CGH *array*

A incidência de cada fenótipo apresentado pelos indivíduos foi obtida através das informações clínicas fornecidas pelos médicos neuropediatras e geneticistas, por meio de questionário. Para 11 indivíduos não foi possível entrevistar os médicos responsáveis, portanto foram coletadas apenas as informações contidas na ficha de indicação clínica, preenchida na ocasião da solicitação do exame.

Informando que o mesmo paciente pode apresentar mais de um fenótipo, na Tabela 1 estão dispostas, as características observadas no total de indivíduos participantes neste estudo. Na Tabela 2 é possível observar como estes fenótipos estão dispostos com relação ao sexo.

Tabela 1 - Número e Porcentagem dos principais fenótipos apresentados pelos 109 indivíduos com indicação clínica para realização do exame de CGH *array*. ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor, DI = Deficiência Intelectual, Dif = Dificuldade, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada e DIS = Deficiência Intelectual Severa.

Fenótipo *	Número	Porcentagem
ADNPM	85	78%
Dismorfias de cabeça/face	49	45%
Autismo	41	38%
DI (Todos)	42	38,5%
Dif. de fala	35	32%
Dif. de motora	33	30%
Dif. de aprendizado	29	27%
Autismo sem DI	21	19%
Hiperatividade	20	18%
DIL	20	18%
DIM	16	15%
Dismorfias de membros	15	14%
Convulsões	15	14%
DIS	6	5%
Ataxia	4	4%

* Podendo um mesmo indivíduo apresentar mais de um fenótipo.

Tabela 2 – Número e percentual de indivíduos que apresentaram cada fenótipo com número e percentual de quantos destes foram do sexo masculino e feminino. ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor, DI = Deficiência Intelectual, Dif = Dificuldade, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada e DIS = Deficiência Intelectual Severa.

Fenótipo *	Total	Masculino	Feminino
ADNPM	85 (78%)	56 (65,9%)	29 (34,1%)
Dismorfias de cabeça/face	49 (45%)	30 (61,2%)	19 (38,8%)
Autismo	41 (37,6%)	31 (75,6%)	10 (24,4%)
DI (Todos)	42 (38,5%)	29 (69%)	13 (31%)
Dif. de fala	35 (32,1%)	27 (77,1%)	8 (22,9%)
Dif. de motora	33 (30,3%)	19 (57,6%)	14 (42,4%)
Dif. de aprendizado	29 (26,6%)	19 (65,5%)	10 (34,5%)
Autismo sem DI	21 (19,3%)	16 (76,2%)	5 (23,8%)
Hiperatividade	20 (18,3%)	16 (80%)	4 (20%)
DIL	20 (18,3%)	15 (75%)	5 (25%)
DIM	16 (14,7%)	11 (68,75%)	5 (31,25%)
Dismorfias de membros	15 (13,8%)	8 (53,3%)	7 (46,7%)
Convulsões	15 (13,8%)	12 (80%)	3 (20%)
DIS	6 (5,5%)	3 (50%)	3 (50%)
Ataxia	4 (3,7%)	2 (50%)	2 (50%)

* Podendo um mesmo indivíduo apresentar mais de um fenótipo.

Paralisia cerebral (PC) e distúrbios psiquiátricos, foram observadas em apenas um paciente cada. O ADNPM (Tabelas 1 e 2) considera a soma das indicações para indivíduos que têm idade inferior a 5 anos, e ainda não podem ser enquadrados com DI, com a anotada nos indivíduos que atualmente tem diagnóstico de DI, mas que quando jovens apresentaram atraso no desenvolvimento.

A principal indicação clínica para solicitar o exame de CGH *array* foi o ADNPM com presença em 78% do total de casos, seguido por distúrbios de cabeça/face (45%). Quando considerada isoladamente a morbidade principal, a deficiência intelectual aparece em 38,5% dos indivíduos (DIL 18%, DIM 15%, DIS 5%). Em crianças com idade inferior a 5 anos a principal causa para realizar o exame foi o ADNPM que aparece em 87,5% deste grupo.

5.3 Análise das CNVs Encontradas

No total de indivíduos analisados foi possível observar a presença de 276 CNVs. Destes, 39 apresentaram apenas uma alteração, 31 apresentaram duas alterações, 17 possuíam três alterações e outros 22 tiveram quatro ou mais alterações. (Gráfico 2). Todos os indivíduos apresentaram pelo menos uma alteração, sendo que um quarto apresenta três ou mais CNVs.

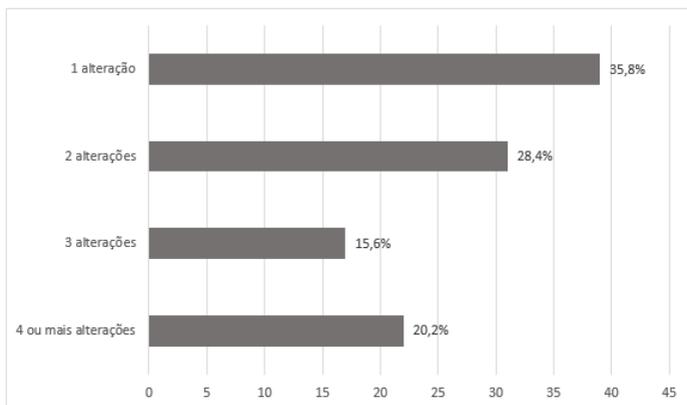


Gráfico 2: Número de indivíduos que apresentam uma, duas, três, quatro ou mais alterações com respectivos percentuais.

Dessas CNVs, 187 eram microduplicações e 89 microdeleções, perfazendo 68% e 32%, respectivamente.

5.4 Classificação das CNVs

Foram analisadas todas as 276 CNVs apresentadas pelos 109 indivíduos, e então classificadas como: CNVs benignas (DGVs), CNVs patogênicas, CNVs potencialmente patogênicas e CNVs de significado incerto (Gráfico 3).

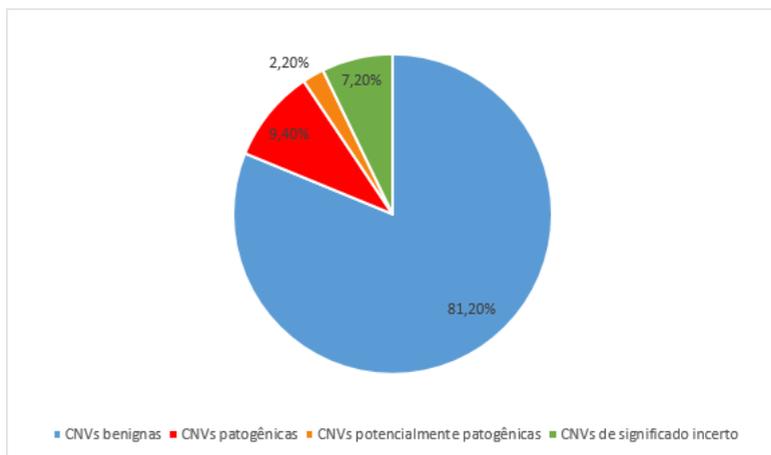


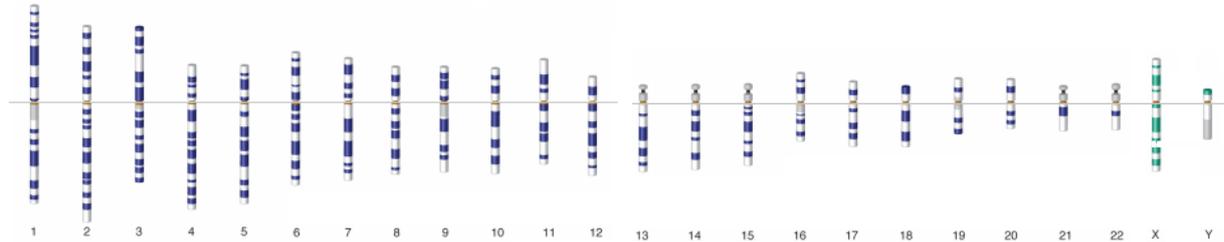
Gráfico 3: Percentual de DGVs e CNVs raras encontradas nos exames de CGH array.

5.5 Análise das CNVs Encontradas por Cromossomo

Observou-se alterações em todos os 23 pares de cromossomos, sendo um maior número presente nos cromossomos 14, 22 e 16, com 60, 29 e 26 alterações, respectivamente. E os menores números nos cromossomos 21 e 19, cada um com apenas uma alteração, o cromossomo

18 com duas alterações e os cromossomos 5 e 6 com três alterações cada. Na Tabela 3 é possível observar as alterações presentes em cada cromossomo, bem como se representam duplicações ou deleções.

Dos 109 indivíduos, analisados, 49 apresentaram alterações não consideradas DGVs em seu CGH *array* o que equivale a ~45% dos indivíduos com alguma alteração rara (23 com CNVs patogênicas; 6 com CNVs potencialmente patogênicas e 20 com CNVs de significado incerto). Com relação as CNVs patogênicas, potencialmente patogênicas e de significado incerto nesta amostra não foi encontrada nenhuma alteração nos cromossomos 5, 10, 12, 19, 21 e Y.



	Chr 01	Chr 02	Chr 03	Chr 04	Chr 05	Chr 06	Chr 07	Chr 08	Chr 09	Chr 10	Chr 11	Chr 12	Chr 13	Chr 14	Chr 15	Chr 16	Chr 17	Chr 18	Chr 19	Chr 20	Chr 21	Chr 22	Chr X	Chr Y	
CNV totais	12	9	6	5	3	3	10	15	12	12	5	5	4	60	9	26	11	2	1	5	1	29	18	13	
Dup	7	5	5	4	1	2	7	8	8	9	1	3	1	39	6	20	10	0	1	5	1	22	10	12	
Del	5	4	1	1	2	1	3	7	4	3	4	2	3	21	3	6	1	2	0	0	0	7	8	1	
CNVs raras	2 16%	3 33%	1 16%	2 40%	0	2 66%	4 40%	3 20%	2 16%	0	2 40%	0	4 100%	1 1,6%	4 44%	6 23%	1 9%	2 100%	0	1 20%	0	4 13%	8 44%	0	
Dup	1	2	0	2	0	1	4	2	2	0	1	0	1	0	3	2	0	0	0	1	0	0	0	5	0
Del	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3	1	1	4	1	2	0	0	0	4	3	0	

Tabela 3 - Número de CNVs totais e raras, duplicações e deleções por cromossomos. Chr = Cromossomo (Ilustração modificado de: <http://www.genome.gov/Glossary/index.cfm?id=208>).

Tabela 4 - Número e percentual de CNVs totais e CNVs raras encontradas por cromossomo.

Cromossomo	CNVs Totais (% das 276 CNVs encontradas)	CNVs raras (% das 52 alterações raras)
1	12 (4,3%)	2 (3,8%)
2	9 (3,3%)	3 (5,8%)
3	6 (2,1%)	1 (2%)
4	5 (1,9%)	2 (3,8%)
5	3 (1,08%)	0
6	3 (1,08%)	2 (3,8%)
7	10 (3,6%)	4 (7,7%)
8	15 (5,4%)	3 (5,8%)
9	12 (4,3%)	2 (3,8%)
10	12 (4,3%)	0
11	5 (1,9%)	2 (3,8%)
12	5 (1,9%)	0
13	4 (1,4%)	4 (7,7%)
14	60 (21,7%)	1 (2%)
15	9 (3,3%)	4 (7,7%)
16	26 (9,4%)	6 (11,5%)
17	11 (4%)	1 (2%)
18	2 (0,72%)	2 (3,8%)
19	1 (0,36%)	0
20	5 (1,9%)	1 (2%)
21	1 (0,36%)	0
22	29 (10,5%)	4 (7,7%)
X	18 (6,5%)	8 (15,3%)
Y	13 (4,7%)	0
Total	276 (100%)	52 (100%)

5.6 Análise das CNVs Raras

Conforme mencionado, as CNVs raras (que não são consideradas polimorfismos benignos), foram subdivididas em três grupos distintos. O primeiro grupo é composto por 23 dos 109 indivíduos (21%), com 26 CNVs (há 3 pessoas com 2 CNVs patogênicas) consideradas clinicamente relevantes (ou seja, patogênicas), este grupo inclui alterações que vão de aproximadamente 206Kb até 22Mb.

Neste grupo foi possível observar: três indivíduos com a conhecida síndrome da deleção do 16p11.2 (OMIM 613444); dois com a síndrome de Di George (OMIM 188400); também conhecida como síndrome da microdeleção 22q11.2; dois com a microdeleção que causa a síndrome de Williams-Beuren (OMIM 609757); dois com a síndrome de microdeleção de Phelan-Mcdermid (OMIM 606232); um com a síndrome de Léri-Weill (OMIM 127300), causada por microdeleções que incluem o gene *Short Stature Homeobox* (SHOX); um com a síndrome de Koolen-De Vries (OMIM 610443), também conhecida como síndrome de microdeleção 17q21.31; um com a síndrome da duplicação do cromossomo 16p13.3 (OMIM 613458); um com o cromossomo 18 em anel, que não havia feito o cariótipo convencional anteriormente, um indivíduo com uma translocação não balanceada dos cromossomos 8 e 13, os outros 9 indivíduos com alterações grandes, de 1,3Mb a 22Mb, comprometendo muitos genes relevantes em uma porção expressiva dos cromossomos em que estão presentes.

O segundo grupo é composto por 6 indivíduos, cada um com ao menos uma CNV potencialmente patogênica para a condição. Em um caso verificou-se uma microdeleção maior que 1 Mb em 3p13-p14.1. Nos demais casos observou-se microduplicações que variam de 261 Kb à 5 Mb, sendo dois casos no cromossomo X em Xq27.3-q28, um no cromossomo 20 em 20q13.33, no cromossomo 6 em 6q15 e no cromossomo 8 em 8q21.13. No terceiro grupo, foram incluídos 20 indivíduos que no seu conjunto apresentaram 20 deleções/duplicações, com tamanhos que variavam de 206 Kb a mais de 1Mb, de significado clínico incerto. Não são alterações observadas na população geral, sendo

assim não podem ser classificadas como DGVs, mas também não há muita informação disponível sobre a região e/ou a função dos genes presentes nas mesmas.

A Tabela 5 apresenta as CNVs raras, bem como sua localização, tamanho, separadas por microdeleção ou microduplicação e sua classificação. Nas Tabelas 6, 7 e 8 é possível observar o número de genes presentes na região, os genes considerados relevantes e o fenótipo presente nos indivíduos com CNVs patogênicas, possivelmente patogênicas e de significado incerto respectivamente. No UCSC *Genome Browser*, além dos genes propriamente ditos, são considerados genes: loci ainda não caracterizados, RNAs não codificantes, e pseudogenes, que estão incluídos nesta contagem.

Tabela 5 – Alterações cromossômicas raras encontradas através do exame de CGH *array* entre os indivíduos analisados.

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	Del*	Dup*	Classificação
1	1q44	246,324,898-246,688,599	364Kb		X	Significado incerto
1	1p36.32-p36.33	1,073,574-2,458,606	1.385Kb	X		Patogênica
2	2p24.1	23,982,758-24,813,485	831Kb		X	Significado incerto
2	2q37.3	236,733,535-237,355,774	622Kb		X	Significado incerto
2	2q13	110,504,318-111,365,996	862Kb	X		Significado incerto
3	3p13-p14.1	68,988,297-70,938,968	1.950Kb	X		Potencialmente Patogênica
4	4q35.2	188,106,543-189,797,261	1.691Kb		X	Significado incerto
4	4q31.1	139,758,054-139,988,340	230Kb		X	Significado incerto
6	6q15	89,917,335-90,485,874	568Kb		X	Potencialmente Patogênica
6	6q15-q21	93,082,925-110,504,681	17.421Kb	X		Patogênica
7	7q11.23	72,732,834-74,155,067	1.422Kb		X	Patogênica
7	7q11.23	72,556,215-74,245,599	1.689Kb		X	Patogênica
7	7q31.32-q33	122,739,692 -136,150,625	13.410Kb		X	Patogênica
7	7p21.3-p22.3	43,376 - 9,454,786	9.411Kb		X	Patogênica
8	8q21.13	82,061,218-84,510,562	2.449Kb		X	Potencialmente Patogênica
8	8p21.1-p11.21	28,393,484-41,026,001	12.632Kb	X		Patogênica
8	8p23.3-23.1	158,048 - 6,914,646	6.757Kb		X	Patogênica
9	9p24.3	319,876-517,446	197Kb		X	Significado incerto
9	9p13.3	34,211,157-34,395,294	184Kb		X	Significado incerto
11	11q14.1	84,050,388-84,415,990	365Kb	X		Significado incerto
11	11q22.3	102,946,063-103,701,279	755Kb		X	Significado incerto
13	13q33.1-q34	104,782,510-112,352,804	7.570Kb	X		Patogênica
13	13q12.12	23,533,358-24,958,572	1.425Kb		X	Significado incerto
13	13q34	114,141,294 - 115,107,733	966Kb	X		Patogênica

Continuação						
Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	Del*	Dup*	Classificação
13	13q21.2	60,425,635-60,688,042	262Kb	X		Significado incerto
14	14q24.2	73,590,938-73,776,190	185Kb	X		Significado incerto
15	15q25.3	85,790,660-86,431,300	640Kb		X	Significado incerto
15	15q25.3	85,884,174-86,112,040	228Kb		X	Significado incerto
15	15q25.1-26.3	80,304,866-102,429,040	22.124Kb		X	Patogênica
15	15q13.2-q13.3	31,073,535-32,446,830	1.373Kb	X		Patogênica
16	16p11.2	28,689,085-29,043,863	355Kb	X		Patogênica
16	16p11.2	28,689,085-29,051,191	362Kb	X		Patogênica
16	16q23.2	80,260,131-80,701,060	441Kb	X		Significado incerto
16	16p11.2-p12.2	21,405,327-29,388,495	7.983Kb	X		Patogênica
16	16p13.3	549,826-1,449,862	900Kb		X	Significado incerto
16	16p13.2-13.3	85,880-14,524,038	14.438Kb		X	Patogênica
17	17q21.31	43,574,907- 44,212,415	637Kb	X		Patogênica
18	18p11.23-p11.32	136,227-8,348,006	8.211Kb	X		Patogênica
18	18q22.2-q23	67,357,305-78,013,728	10.656Kb	X		Patogênica
20	20q13.33	61,854,236-62,054,955	200Kb		X	Potencialmente Patogênica
22	22q11.21	18,648,855-21,269,224	2.620Kb	X		Patogênica
22	22q13.2-q13.33	43,600,479-51,197,766	7.597Kb	X		Patogênica
22	22q13.33	50,788,193-51,115,526	327Kb	X		Patogênica
22	22q11.21	18,648,855-21,058,888	2.410Kb	X		Patogênica
X	Xq21.31	88,888,554-89,199,512	310Kb		X	Significado incerto
X	Xq27.3-q28	146,425,635-151,604,987	5.179Kb		X	Potencialmente Patogênica
X	Xq27.3-q28	146,418,810-151,604,987	5.186Kb		X	Potencialmente Patogênica
X	Xq28	152,735,080-152,996,703	261Kb		X	Significado incerto
X	Xp22.33	679.520-950,907	271Kb	X		Patogênica

Continuação						
Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	Del*	Dup*	Classificação
X	Xp22.33	372,029-578,764	206Kb	X		Patogênica
X	Xq13.3	74,447,412-74,654,324	206Kb		X	Significado incerto
X	Xp22.31	6,449,752 - 8,165,644	1.715Kb	X		Patogênica
Total				25	27	

*Del – Deleção; Dup – Duplicação.

Tabela 6 – CNVs patogênicas encontradas através do exame de CGH *array*, contendo o número de genes presentes na região, os principais genes e os fenótipos de cada indivíduo. ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor, DI = Deficiência Intelectual, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada, DIS = Deficiência Intelectual Severa, Aut = Autismo, Hiperativ = Hiperatividade, Dif = Dificuldade, Mot = Motora e Dismor = Dismorfia.

Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
13150	1	1p36.32-p36.33	1,073,574-2,458,606	62	GABRD, SKI	DIM, Dismor. cabeça/face
1324	6	6q15-q21	93,082,925-110,504,681	120	SIM1, SEC63	ADNPM, Dismor. cabeça/face e membros
1393	7	7q11.23	72,732,834-74,155,067	29	WBSCR27, WBSCR28	DIM, Aut e Hiperativ.
1399	7	7q11.23	72,556,215-74,245,599	37	WBSCR27, WBSCR28	DIL, Aut

Continuação						
Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
13109	7	7q31.32-q33	122,739,692 -136,150,625	173	WASL	DIL, Dif. Mot, Hiperativ, Dismor. cabeça/face e membros
13155	7	7p21.3-p22.3	43,376 - 9,454,786	145	RNF216	DIM, Convulsões, Dismor. cabeça/face
1369	8	8p21.1-p11.21	28,393,484-41,026,001	120	NRG1, FGFR1, ANK1	DIL, Dismor. cabeça/face
1376	8	8p23.3-23.1	158,048 - 6,914,646	61	ARHGEF10	DIL, Hiperativ.
1308	13	13q33.1-q34	104,782,510-112,352,804	48	DAOA	ADNPM, Dif. Aprend, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face
1376	13	13q34	114,141,294 - 115,107,733	22	TFD1, GRK1, RASA3, GAS6	DIL, Hiperativ.
1381	15	15q25.1-26.3	80,304,866-102,429,040	306	AKAP13, CPEB1, NTRK3	DIS, Aut, Convulsões, Dif. de fala, Hiperativ, Dismor. cabeça/face e membros
13100	15	15q13.2-q13.3	31,073,535-32,446,830	14	CHRNA7	DIL, Aut, Hiperativ.
1320	16	16p11.2	28,689,085-29,043,863	17	SH2B1	Aut

Continuação						
Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
1321	16	16p11.2	28,689,085-29,051,191	18	SH2B1	Aut
1391	16	16p11.2-p12.2	21,405,327-29,388,495	123	SH2B1	DIL, Aut, Dif. de fala, Hiperativ, Dismor. cabeça/face
13118	16	16p13.2-13.3	85,880-14,524,038	364	CREBBP	DIS, Aut
13104	17	17q21.31	43,574,907- 44,212,415	14	KANSL1	Dif. de fala, Convulsões, Dismor. cabeça/face
1341	18	18p11.23-p11.32	136,227-8,348,006	76	TGIF	DIS, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face
1341	18	18q22.2-q23	67,357,305-78,013,728	74	RTTN, CTDP1	DIS, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face
1333	22	22q11.21	18,648,855-21,269,224	105	TBX1	DIL, Dif. Mot, Hiperativ.
1357	22	22q13.2-q13.33	43,600,479-51,197,766	131	UPK3A, FBLN1, SHANK3	DIM, Aut, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face e membros
1365	22	22q13.33	50,788,193-51,115,526	20	SHANK3	DIS, Aut, Convulsões, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face

Continuação						
Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
13123	22	22q11.21	18,648,855-21,058,888	102	TBX1	ADNPM, Dif. Aprend, Dismor. cabeça/face
1360	X	Xp22.33	679,520-950,907		SHOX	Baixa estatura
1360	X	Xp22.33	372,029-578,764		SHOX	Baixa estatura
13136	X	Xp22.31	6,449,752 - 8,165,644	10	STS	ADNPM, Dismor. cabeça/face

Tabela 7 – CNVs potencialmente patogênicas encontradas através do exame de CGH *array*, contendo o número de genes presentes na região, os principais genes e os fenótipos de cada indivíduo. ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor, DI = Deficiência Intelectual, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada, DIS = Deficiência Intelectual Severa, Aut = Autismo, Hiperativ = Hiperatividade, Dif = Dificuldade, Mot = Motora e Dismor = Dismorfia.

Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
13121	3	3p14.1-p13	68,988,297-70,938,968	16	MITF, TMF1	Surdez não sindrômica
1303	6	6q15	89,917,335-90,485,874	10	GABRR1, GABRR2	DIL, Dif. Mot, Hiperativ.
1325	8	8q21.13	82,061,218-84,510,562	23	IMPA1	ADNPM, Dismor. cabeça/face
1340	20	20q13.33	61,854,236-62,054,955	10	CHRNA4	ADNPM, Dif. Mot.
1331	X	Xq27.3-q28	146,425,635-151,604,987	60	FMR1, AFF2	DIL, Dismor. cabeça/face
1332	X	Xq27.3-q28	146,418,810-151,604,987	60	FMR1, AFF2	DIL, Dismor. cabeça/face

Tabela 8 – CNVs de significado incerto encontradas através do exame de CGH *array*, contendo o número de genes presentes na região, os principais genes e os fenótipos de cada indivíduo. ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor, DI = Deficiência Intelectual, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada, DIS = Deficiência Intelectual Severa, Aut = Autismo, Hiperativ = Hiperatividade, Dif = Dificuldade, Mot = Motora e Dismor = Dismorfia.

Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
1306	1	1q44	246,324,898-246,688,599	2	SMYD3	Aut, Dif. Mot, Convulsões, Hiperativ.
1201	2	2p24.1	23,982,758-24,813,485	18	ATAD2B, UBXN2A	DIM, Sobrepeso
1304	2	2q37.3	236,733,535-237,355,774	6	AGAP1, GBX2	ADNPM, Convulsões, Dismor. cabeça/face
1328	2	2q13	110,504,318-111,365,996	23	NPHP1	Comp. neurológico
13105	4	4q35.2	188,106,543-189,797,261	14	ZFP42	ADNPM, Dif. de fala
13157	4	4q31.1	139,758,054-139,988,340	2	CCRN4L	ADNPM, Dismor. cabeça/face
13115	9	9p24.3	319,876-517,446	4	KANK1, DOCK8	Aut, Dif. de fala, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face

Continuação						
Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
13163	9	9p13.3	34,211,157-34,395,294	7	NUDT2, UBAP1	DIS, Aut, Convulsões, Dif. de fala, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face
1317	11	11q14.1	84,050,388-84,415,990	2	DLG2	Aut, Dif. Aprend, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face, Dif. de fala
1371	11	11q22.3	102,946,063-103,701,279	5	DYNC2H1	ADNPM, Dif. Aprend, Dif. Mot, Dismor. cabeça/face
1363	13	13q12.12	23,533,358-24,958,572	25	SGCG, SACS	DIM
13112	13	13q21.2	60,425,635-60,688,042	2	DIAPH3	ADNPM, Dif. Aprend
1353	14	14q24.2	73,590,938-73,776,190	4	PSEN1, NUMB1	Aut, Dif. de fala
1325	15	15q25.3	85,790,660-86,431,300	11	AKAP13	ADNPM, Dismor. cabeça/face
1335	15	15q25.3	85,884,174-86,112,040	4	AKAP13	ADNPM, Dif. Aprend, Dif. de fala

Continuação						
Indivíduos	Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Nº de genes	Genes importantes	Fenótipo
1356	16	16q23.2	80,260,131-80,701,060	3	DYNLRB2, CDYL2	DIL, Aut, Dif. Mot, Dif. de fala, Hiperativ, Dismor. cabeça/face
13104	16	16p13.3	549,826-1,449,862	60	CACNA1H	Dif. de fala, Convulsões, Dismor. cabeça/face
1358	X	Xq28	152,735,080-152,996,703	13	ABCD1	Sem dismorfologias
1301	X	Xq21.31	88,888,554-89,199,512	1	TGIF2LX	DIM, Dif. Mot.
13112	X	Xq13.3	74,447,412-74,654,324	4	ZDHHC15	ADNPM, Dif. Aprend

5.7 Taxa de Diagnóstico e Relação dos Fenótipos com Diagnóstico

Observou-se que dos 109 indivíduos, 29 apresentaram CNVs patogênicas ou potencialmente patogênicas, o que equivale a uma taxa diagnóstica de 26,6%. A relação dos fenótipos apresentados pelos indivíduos, que obtiveram diagnósticos pode ser observada na Tabela 9.

Com relação aos fenótipos que obtiveram maior taxa de diagnósticos destaca-se a DIS, DIL e Hiperatividade, com ~66%, 50% e 40% respectivamente. Das 35 crianças com ADNPM encontrou-se CNVs patogênicas ou potencialmente patogênicas em 5 dessas crianças (14,3%), indivíduos que apresentavam uma dificuldade de aprendizado foram os menos diagnosticados (6,9%) no presente trabalho.

Tabela 9 – Porcentagem dos diagnósticos obtidos com relação aos fenótipos apresentados pelos indivíduos com indicação clínica para realização do exame de CGH array. DI = Deficiência Intelectual, DIL = Deficiência Intelectual Leve, DIM = Deficiência Intelectual Moderada e DIS = Deficiência Intelectual Severa, Dif = Dificuldade e ADNPM = Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor.

Fenótipo *	Número Total de indivíduos	Indivíduos com alterações causais	Porcentagem de diagnóstico
DI (Todos)	42	14	42,8%
DIL	20	10	50%
DIM	16	4	25%
DIS	6	4	66,66%
Hiperatividade	20	8	40%
Dismorfias de cabeça/face	49	18	36,7%
Dismorfias de membros	15	5	33,33%
Convulsões	15	4	26,6%
Ataxia	4	1	25%
Dif. motora	33	7	21,2%
Dif. de fala	35	7	20%
ADNPM (5 anos ou menos)	35	5	14,3%
Autismo sem DI	21	2	9,5%
Dif. de aprendizado	29	2	6,9%

* Podendo um mesmo indivíduo apresentar mais de um fenótipo.

6. DISCUSSÃO

6.1 Análise dos Exames de CHG array

A composição da amostra reflete um predomínio de indivíduos do sexo masculino (Gráfico 1). Este fato corrobora com o encontrado na maioria dos outros estudos, que relatam ~30% mais homens diagnosticados com DI do que mulheres (STEVENSON et al. 2000; KAUFMAN; AYUB; VINCENT, 2010). Para o autismo a diferença de gêneros é ainda mais acentuada, com proporção de 4,5 meninos para cada menina (Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance

Year 2010). Estas diferenças entre homens e mulheres não são totalmente explicadas, porém são atribuídas a mutações em genes localizados no cromossomo X, a maior susceptibilidade de fetos masculinos a danos pré ou peri-natais, aliados a fatores ainda não esclarecidos (CHRISTIAN, 2001; MARIS et al., 2010).

Cerca de um terço dos indivíduos para os quais foi solicitada a realização de CGH *array* tem idade abaixo de cinco anos, sendo que 70% destes são meninos, um pouco mais de dois terços, corroborando com os achados da literatura (STEVENSON et al., 2000).

6.2 Análise dos Fenótipos Apresentados pelos Indivíduos com Indicação Clínica para Realizar o Exame de CGH *array*

As principais indicações clínicas para realizar o exame de CGH *array*, em dados encontrados na literatura em indivíduos ainda não classificados com uma síndrome definida, são o atraso no desenvolvimento, algum grau de comprometimento intelectual e a presença de características dismórficas, nesta ordem (DARILEK et al., 2008). Um estudo verificou CNVs relevantes em 18,6% dos indivíduos com deficiência intelectual e/ou características dismórficas associadas (SIGGBERG et al., 2010), sendo esses fenótipos também os principais observados nos sujeitos analisados na presente pesquisa (Tabela 1). Porém, a frequência em que CNVs relevantes foram encontradas é mais que o dobro que o relatado na literatura. Possivelmente isto se deva a uma maior resolução da plataforma utilizada no presente trabalho.

Considerando a principal indicação para o exame, predomina, no presente estudo, a indicação por ADNPM (78%), dismorfias de cabeça/face (45%) e em seguida a deficiência intelectual em grau variado e a presença de autismo (com e sem DI), ambos com ~38%. Com frequência menor, encontra-se a dificuldade de fala (32%), dificuldade motora (30%), dificuldade de aprendizado (27%), hiperatividade (18%), dismorfias de membros e convulsões (14%), e ataxia (4%) (Tabela 1).

O ADNPM, principal indicação clínica para a realização do exame (78%), na maior parte das vezes se dá como um diagnóstico retrospectivo, pois o diagnóstico de DI envolve aspectos, inclusive no que tange a aplicação de um teste de QI, que só podem ser acessados após os 5 anos de idade. Observou-se apenas 40 dos 109 indivíduos com idade igual ou inferior a 5 anos, destes 87,5% apresentaram o ADNPM como indicação para o CHG *array*. Considera-se que as crianças que até esta idade apresentam ADNPM, eventualmente podem vir a não desenvolver uma DI posteriormente, porém a maioria acabará recebendo este diagnóstico (SHAFFER, 2005).

Com relação ao sexo, todos os fenótipos, exceto DIS e ataxia apresentados por apenas 3 e 2 indivíduos, respectivamente, de cada sexo, apareceram maior número em homens do que em mulheres. Como a amostra possui uma maior prevalência de indivíduos do sexo masculino esta observação era esperada.

Para a maioria dos diagnósticos de DI no Brasil o teste de QI não é utilizado de forma corriqueira, principalmente quando a DI é evidente. Na maioria das vezes, os médicos fazem o diagnóstico de deficiência intelectual através de uma série de características associadas que o

indivíduo apresenta em grau variado, conforme detalhado no item 1.1.3 – Diagnóstico e Avaliação, o que por fim, se assemelha muito ao preconizado na nova versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM*); DSM V, que destituiu o teste de QI como necessidade para estabelecer o diagnóstico e/ou grau de deficiência intelectual, considerando outros parâmetros que são mais relacionados ao aspecto funcional do indivíduo.

O fato da DIL aparecer mais dentre as indicações médicas para realização do CGH *array* que DIM ou DIS surpreende, uma vez que imagina-se que o exame de CGH *array* tenderia a ser mais solicitado em casos de DIM e DIS. Há pesquisadores que relatam que seja mais provável obter resultados positivos do exame de CGH *array* nos casos mais graves de deficiência intelectual, (BEAUDET, 2013), dados que o presente estudo contesta, conforme será discutido mais adiante.

6.3 Análise das CNVs Encontradas

CNVs são geradas por diversos mecanismos de mutação, incluindo recombinação meiótica dirigida por homologia e não-homologia, reparação de quebras de dupla cadeia de DNA e erros na replicação (CONRAD et al, 2010). Sabe-se que as CNVs são extremamente comuns na população (IAFRATE et al, 2004), por esse motivo o número de CNVs presentes em cada indivíduo (Gráfico 2) não é proporcional a patologia que ele apresenta. Ou seja, não é correto afirmar que quanto mais CNVs determinado indivíduo possui, maior será

seu comprometimento. No presente estudo 12 dos 29 indivíduos (41,3%), que tiveram CNVs classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas apresentaram uma única alteração e esta já foi suficiente para ser determinante de sua patologia. O que determina se uma CNV é patogênica ou não é a região que ela abrange, os genes presentes nessa região, além de seu tamanho e se é uma microduplicação ou microdeleção. Porém, a quantidade de CNVs raras por paciente tem sido relacionadas com fenótipo mais grave (GIRIRAJAN, et al., 2012).

No presente estudo foram encontradas um maior número de microduplicações se compararmos a microdeleções, o que era esperado uma vez que acredita-se que microduplicações são mais comuns no genoma humano do que microdeleções (BEAUDET, 2013). Em geral, mas não uniformemente, deleções são mais prováveis de serem causadoras de um fenótipo do que duplicações. Segundo Battaglia et al. (2013) duplicações geralmente causam um fenótipo mais leve, o que possibilitaria que houvesse uma seleção favorável, dessas microduplicações, por isso ocorrem em maior número.

Os genes geralmente têm mecanismos regulatórios que permitem a adequação da expressão de seu produto de acordo com necessidade. Existem, porém, genes que são sensíveis a dosagem, onde estes mecanismos regulatórios não conseguem compensar o efeito de dose exercido por uma deleção ou duplicação (EDGER; PIRES, 2009).

Uma CNV pode ser responsável pelo desenvolvimento de uma doença se esta inativa ou também ativa exacerbadamente um ou mais genes sensíveis à dosagem, o que justifica o aparecimento de patologias ligadas a duplicações, como foi identificado em um estudo uma forte

associação de duplicações com o transtorno de espectro autista (SANDERS et al, 2010). Exemplos encontrados no presente estudo são a síndrome de duplicação do cromossomo 16 região 16p13.3, onde o gene envolvido *Creb-Binding Protein* (CREBBP) é sensível a dosagem, como Thienpont et al. (2010) relatou em seu estudo, e a síndrome de Williams-Beuren, onde os resultados de diferentes estudos (SOMERVILLE et al., 2005; BERG et al., 2007; TORNIERO et al., 2007) sugerem que os genes presentes na região 7q11.23 são extremamente sensíveis a dosagem.

Há mecanismos de regulação gênica e modulação da atividade de enzimas que podem contrabalancear o aumento ou diminuição da produção de um RNA por duplicação ou deleção do gene (ALBERTS et al., 2009). Para duplicações há mecanismos adicionais que possibilitam manter a homeostase no caso de produção excessiva de um RNA ou uma proteína, como promover a eliminação acelerada via degradação ou exocitose do RNA e/ou proteína produzidos em excesso. Outro mecanismo que explica a maior patogenicidade de deleções é a possibilidade de ocorrer a combinação da deleção do alelo de um cromossomo com um alelo disfuncional (por mutação ou por *imprinting*) no cromossomo homólogo de um gene que causa uma condição autossômica recessiva. Isto também dificulta a interpretação de CNVs consideradas benignas quando representam deleção que contém genes causadores de doenças recessivas.

A capacidade do CGH *array* de identificar pequenas deleções permite o diagnóstico de doenças causadas por poucos genes, bem como identificar genes com haploinsuficiência, o que aumenta a capacidade de diagnóstico deste teste (MILLER et al, 2010). Se ocorrer uma perda de

um gene haploinsuficiente o alelo que resta não é capaz de suprir a falta da cópia deletada, o que acarreta no aparecimento do fenótipo.

6.4 Classificação das CNVs

Determinar o significado clínico de variantes identificadas pelo CGH *array* requer muita atenção, percepção e estudo, mesmo com as plataformas atuais que oferecem alta resolução do genoma e ampla detecção de CNVs clinicamente significativas. O maior desafio está na interpretação das variantes de significado clínico incerto, muitas vezes chamadas de VOUS, do inglês *variants of uncertain clinical significance*; relatórios de CNVs observadas entre laboratórios clínicos indicam uma ampla variabilidade de interpretação (MILLER et al, 2010).

As CNVs benignas (224/276) foram assim classificadas por estarem presentes no banco de dados de variantes comuns à população geral (DGV), são por isto chamadas de DGVs e não possuem nenhuma relação causal com a patologia do indivíduo (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2010). Aparecem em maior número, cerca de 81% (Gráfico 3), do que as variantes raras, como era de se esperar uma vez que se sabe que as CNVs são comuns no genoma humano.

6.5 Análise das CNVs Encontradas por Cromossomo

A partir dos resultados dos exames verificou-se que 18,80% das 276 alterações encontradas tem ou podem ter, em maior ou menor grau, alguma relação causal com a patologia apresentada. Considerando todas

as CNVs encontradas, foram encontradas alterações em todos os 23 pares de cromossomos pertencentes a espécie humana (Tabela 3), com um maior número de alterações presentes nos cromossomos 14, 22 e 16. O cromossomo 22 estar entre os cromossomos com maior número de CNVs, com 29 das alterações, foi surpreendente uma vez que era esperado encontrar um menor número de CNVs nos cromossomos menores, não só por seu tamanho, mas por possuir genes considerados conservados na espécie humana. Isto é confirmado no caso dos cromossomos 21 e 19 que foram aqueles onde menos alterações foram encontradas, uma para cada um.

Dos 109 indivíduos, 46 apresentaram CNVs classificadas como patogênicas, potencialmente patogênicas e de significado incerto, o que equivale a 45% dos indivíduos com alguma alteração rara. O cromossomo que apresentou o maior número dessas alterações foi o X (Tabela 3). O fato do cromossomo X apresentar o maior número de alterações raras quando se estuda doenças ligadas ao neurodesenvolvimento é algo bastante esperado, devido as evidências genômicas e conhecimento acumulado que ligam genes presentes no cromossomo X a transcritos de células neuronais e ao fato dos homens possuírem apenas uma cópia deste cromossomo, que põe em evidência alterações em qualquer gene relevante (TURKHEIMER et al, 2014).

O cromossomo 18 apresentou duas alterações em um mesmo indivíduo, com perda de genes sub-teloméricos. Esta alteração foi suficiente para causar a patologia do indivíduo, confirmando a relevância destas regiões no diagnóstico de indivíduos afetados.

Em um estudo feito com 215 indivíduos, verificou-se que CNVs encontradas no cromossomo 15 são mais comumente observadas em pessoas com espectro autista enquanto as alterações presentes nos cromossomos 2 e 22 são mais envolvidas naqueles com dificuldades de aprendizagem (ROBERTS et al, 2014). No presente estudo foram observadas nove alterações no cromossomo 15 sendo cinco consideradas benignas e duas consideradas de significado clínico incerto, presentes em duas crianças com idade inferior a 5 anos com ADNPM, dificuldade de fala e motora. As outras duas (~22%) consideradas patogênicas foram observadas em indivíduos que apresentaram como fenótipo DIS com autismo e DIL com autismo.

No cromossomo 2 foram encontradas nove alterações, sendo seis benignas e três consideradas de significado clínico incerto o que não permite relacionar as alterações presentes no cromossomo 2 com nenhum diagnóstico conclusivo. No cromossomo 22 foram observadas 29 CNVs, sendo 25 benignas e quatro patogênicas, presentes em indivíduos com algum grau de DI e em uma criança diagnosticada com ADNPM.

Em um estudo anterior com 122 indivíduos analisados com as plataformas 44K ou 60K da Agilent Technologies, seis cromossomos não apresentaram CNVs raras, sendo eles os cromossomos 6, 10, 20, 21, 23 e Y (ANSELMINI M, 2013). No presente trabalho não foi observada nenhuma CNV rara nos cromossomos 5, 10, 12, 19, 21 e Y, havendo uma concordância de 3 cromossomos (10, 21 e Y) entre os trabalhos. Como já relatado anteriormente nos cromossomos 19 e 21 foram observadas uma única alteração benigna. Já os cromossomos 5, 10 e 12 apresentaram algumas alterações normais o que pode sugerir que estes cromossomos

sejam mais propensos a apresentarem CNVs sem relevância clínica, assim como o cromossomo Y que possui poucos genes e muitos pseudogenes que dificilmente causariam estes tipos de patologias.

6.6 Análise das CNVs Raras

As CNVs patogênicas (23/276) correspondem a 9,4% (Gráfico 3 e Tabela 6) das CNVs observadas. Seus tamanhos variam de 206 Kb a 22 Mb e foram consideradas causais para o fenótipo. Analisando cada caso, a CNV ou foi responsável por uma síndrome conhecida, em que as características fenotípicas e os dados clínicos correspondiam ao que era observado na literatura referente a determinada síndrome, ou por serem alterações muito grandes onde não havia uma síndrome específica mas sim um conjunto grande de genes responsáveis por diversas patologias que conjuntamente explicavam o fenótipo apresentado pelo indivíduo.

Muitos estudos feitos com plataformas mais antigas como as 105k ou 180k da Agilent Technologies (Santa Clara, CA) (BARTINIK et al., 2014; COUTTON et al., 2014; ROBERTS et al., 2014,) necessitam utilizar diferentes técnicas (MLPA, PCR, FISH) para confirmação dessas CNVs. No presente trabalho esta confirmação não é necessária pois a plataforma CytoScan® HD da Affymetrix, possui mais de 2,6 milhões de marcadores de número de cópias, alta densidade de sondas e SNPs, utilizados para conferir a precisão dos achados (Affymetrix, 2013).

Porém, exemplificando a dinâmica da evolução dos conhecimentos na área, alguns exemplos de genes observados nessas

regiões, para os quais evidências recentes de um papel importante no desenvolvimento leva a sua reclassificação como a *Set and Mynd Domain-containing protein 3* (SMYD3), que desempenha um papel na regulação da transcrição como um membro do complexo de RNA polimerase (OMIM 608783). Têm papel fundamental na regulação da sinalização do oncogene RAS (MAZUR et al, 2014).

As CNVs consideradas potencialmente patogênicas (6/276) correspondem a 2,2% (Gráfico 3), variam de 261Kb a 5,1Mb e possuem na região alterada genes considerados potenciais candidatos para determinação do fenótipo, porém com pouco apoio na literatura sobre sua patogenicidade em CNVs. A seguir serão discutidos de forma detalhada os 6 casos que apresentaram CNVs potencialmente patogênicas.

6.6.1 Caso 1: Indivíduo 13121

Uma menina com 7 anos de idade cujo fenótipo é surdez não sindrômica e pele bem clara, com uma microdeleção de 1.950Kb em 3p14.1-p13 (Tabela 7). Nesta região há 16 genes, sendo que o de maior importância é o gene MITF (fator de transcrição associado a microfalmia). MITF codifica um fator de transcrição com motivos do tipo zíper de leucina hélice-alça-hélice básico (bHLHZip) e é um regulador mestre do desenvolvimento de melanócitos. Mutações pontuais nesse gene, herdadas de forma dominante, foram encontrados em pacientes com hipopigmentação e surdez características da síndrome de Waardenburg do tipo IIA (SW-II) e na síndrome de Tietz (ST), caracterizada por surdez congênita e despigmentação quase lembrando o albinismo.

Adicionalmente mutações neste gene foram encontradas em casos de melanoma somático e de origem germinativa. A haploinsuficiência de MITF chegou a ser sugerida como mecanismo subjacente para os fenótipos mais leves apresentados pela SW do tipo IIA (ZHANG et al., 2012). Nas mutações descritas havia formação de proteína, porém alterada. No intuito de entender o papel do gene alterado na patogênese das três condições, Grill et al. (2013) testou 24 mutações descritas na literatura, 18 das quais encontradas em indivíduos com SW tipo IIA e ST, e 6 em indivíduos com melanoma. Constatou que a maioria das mutações (mas não todas) que causa SW tipo IIA e ST resultam em proteínas que não conseguem se ligar ao DNA. Sugere então que as duas síndromes de surdez e despigmentação se devem a mutações de perda de função deste fator de transcrição sem, no entanto, poder descartar a causa como um ganho de função – ou seja, onde o produto gênico interfere em outro processo, conforme é frequente em mutações dominantes. A deleção encontrada na paciente descrita aqui confirma que a haploinsuficiência deste gene é suficiente para causar a surdez congênita e possivelmente a hipopigmentação encontradas em SW tipo 2 ou ST. É provável que as apresentações ligeiramente distintas destas duas condições se devam a interações com o contexto genômico de cada indivíduo afetado.

Já as mutações encontradas em melanoma exibem capacidade de ligação normal ao DNA e pequenas variações nas propriedades de ativação, eventualmente modificando o momento/intensidade/alvos de transcrição (GRILL et al. 2013), não sendo relevantes para a patologia no caso descrito.

6.6.2 Caso 2: Indivíduo 1303

Um menino com 15 anos de idade cujo fenótipo é DIL, dificuldade visual, dificuldade motora e hiperatividade, sem dismorfologias marcantes, com cariótipo normal, apresentando uma CNV benigna em 22q11.22, apresenta uma microduplicação de 568Kb em 6q15 (Tabela 7), considerada potencialmente patogênica. Nesta região há 10 genes, sendo que os considerados candidatos para o possível envolvimento na patologia apresentada são os genes GABRR1 e GABRR2 e *Ankyrin Repeat Domain* (ANKRD6). GABRR1 e GABRR2 codificam as subunidades rho1 e rho2 dos receptores pentaméricos GABA-C/GABA-A, que são membros da superfamília de canais de cloreto dependente e ligantes de ácido gama - aminobutírico (GABA). GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante no cérebro dos mamíferos, onde é amplamente distribuído em regiões tais como o córtex cerebral, hipocampo, tálamo, gânglios basais, cerebelo, no hipotálamo e no tronco cerebral, compreendendo cerca de um terço das sinapses (CUTTING et al., 1991; CUTTING et al., 1992). Disfunções sutis dos neurônios GABAérgicos contribuem para inúmeros fenótipos neuropsiquiátricos, incluindo o autismo, o transtorno bipolar com déficits cognitivos e a esquizofrenia infantil com deficiência intelectual (CHAO, et al., 2010; COGHLAN, et al., 2012). Desordens do desenvolvimento neurológico têm sido atribuídas a CNVs presentes em regiões que, entre outros, também contêm agrupamentos de genes receptores de GABA-A (POLAN et al, 2014). Há diversas alterações nessas regiões já bem conhecidas, que incluem como fenótipo atrasos no desenvolvimento, na fala, motora, autismo e convulsões (HOGART et al., 2010).

Já o gene ANKRD6 codifica a diversina, uma proteína que participa da sinalização por WNT. Os sinais de WNT são transduzidos através da via da beta-catenina ou pela via de polaridade celular planar (PCP). A via clássica da beta-catenina regula a pluripotência das células tronco e o destino das células durante o desenvolvimento. A PCP é responsável pela polarização coordenada de células vizinhas dentro do plano do tecido, necessária para numerosos processos de desenvolvimento para a forma e a função de muitos tecidos e órgãos, participando inclusive no processo de fechamento do tubo neural (WU, et al., 2011). A sinalização PCP é altamente sensível a dosagem e exibe uma relação antagônica com a via da β -catenina. A diversina ativa a sinalização pela PCP, enquanto simultaneamente inibe a via da β -catenina (ALLACHE, et al., 2014). Em ratos foi vista a expressão do RNAm de Ankrd6 no corpo estriado, olhos, pulmões e rins (KATOH; KATOH, 2005). Considerando a sensibilidade a dosagem da via PCP, é plausível considerar que uma duplicação de ANKRD6 possa desequilibrar a homeostasia desta via, contribuindo para o fenótipo. O fato de ser expressa na região ocular poderia explicar a baixa visão apresentada pelo menino.

6.6.3 Caso 3: Indivíduo 1325

Um menino com 3 anos de idade cujo fenótipo é ADNPM, crânio braquicefálico, fonte proeminente, dismorfias genitálias, hidrogenose grave à direita, epispádia, extrofia da bexiga e gastroquise, possui uma microduplicação de 2.449Kb em 8q21.13 (Tabela 7).

A extrofia de bexiga e a gastroquise fazem parte dos defeitos de fechamento da parede abdominal, mas sua etiologia é incerta, podendo se dever a disrupções ou defeitos relacionados a proliferação, migração, fusão e apoptose celular, assim como a perturbações nos processos de adesão celular. O fechamento da parede abdominal e do tubo neural ocorrem mais ou menos na mesma época do desenvolvimento, em torno da quarta semana gestacional, e envolvem processos semelhantes (SADLER, 2010).

Na região duplicada na criança afetada há 23 genes, entre os quais alguns se destacam por ter importante papel no desenvolvimento e/ou indícios de serem sensíveis a dosagem: Proteína mielina periférica 2 (PMP2), *Sorting Nexin 16* (SNX16), *Charged Multivesicular body Protein 4C* (CHMP4C) e *Myo-inositol monophosphatase* (IMPA1).

O gene PMP2 (proteína periférica da mielina), codifica uma pequena proteína básica, que é um dos principais componentes da mielina periférica e parece estar relacionada com o transporte de ácidos graxos ou do metabolismo dos lípidos de mielina. Recentemente PMP2 foi identificado como um gene sensível a dosagem (MAKANAE, et al. 2013).

SNX16, que codifica para a proteína de classificação de nexinas 16, é membro de uma ampla família de proteínas de ligação ao fosfatidilinositol fosfato, envolvidas na mediação de uma variedade de processos como endocitose, transporte e distribuição intracelular de proteínas e sinalização celular. SNX16 tem sido implicado em vias de sinalização como EGF, Proteína Morfogenética Óssea (*Bone Morphogenetic Proteins* - BMP) e Wnt. Estas vias têm funções nos processos de

sobrevivência proliferação e regulação da migração celular. SNX16 estaria envolvido na migração, mas não no crescimento celular. A superexpressão de SNX16 reduz a migração celular, enquanto o knockdown de SXT16 tem o efeito oposto (LEILEI, et al., 2013). Por outro lado SNX16 tem sido implicado no controle do crescimento das sinapses na interface de compartimentos endossomais (RODAL et al., 2014).

CHMP4C codifica uma proteína de corpos multi vesiculares e faz parte do complexo de *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT-III), um complexo de transporte e triagem vesicular, que participa da distribuição endossomal de proteínas a lisossomos. Este complexo tem importante função no momento final da separação de membranas celulares, após a constrição do anel de actina e miosina que ocorre no final da citocinese celular. CHMP4C é crítica na regulação deste processo, integrando o momento da separação com o controle de ciclo celular (CARLTON et al, 2012) e a super-expressão de CHMP4C inibe a citocinese (CARLTON; MARTIN-SERRANO, 2009).

IMPA1 codifica a inositol monofosfatase 1, que está implicada na via de sinalização celular do fosfatidil-inositol. Desfosforila monofosfato de mio-inositol para gerar mio-inositol livre, um precursor de fosfatidilinositol, importante modulador na produção de segundos mensageiros como mioinositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol. Tem sido implicado principalmente no distúrbio bipolar e, mais recentemente também no desenvolvimento craniofacial (CRYNS et al., 2008; OHNISHI et al., 2014).

6.6.4 Casos 4 e 5: Indivíduos 1331 e 1332

São dois irmãos o primeiro com 18 e o segundo com 16 anos cujos fenótipos são os mesmos, ambos possuem DIL, sobrepeso, dismorfias leves, bochechas cheias, lábios grossos e olhos amendoados. O cariótipo se apresentou normal, exame de CGH *array* foi então realizado, revelando para ambos os pacientes praticamente a mesma CNV. O indivíduo 1331 possui uma microduplicação de 5.179Kb em Xq27.3-q28 coordenada genômica (146,425,635-151,604,987; Hg19), e o indivíduo 1332 possui microduplicação praticamente igual, porém de tamanho um pouco maior, de 5.186Kb em Xq27.3-q28 coordenada genômica (146,418,810-151,604,987; Hg19) (Tabela 7). Nesta região há 60 genes, sendo o de maior importância o gene *Fragile X Mental Retardation 1* (FMR1). Conhecido pela sua associação com vários fenótipos de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, como na síndrome do X frágil, onde sua perda de função leva à deficiência intelectual (VENGOECHEA et al, 2012). Em seu estudo Rio et al. (2010) descreveram uma duplicação de 5,12Mb em Xq27.3-q28, que inclui o gene FMR1, em três homens de uma mesma família com DIL, baixa estatura, hipogonadismo, dismorfias faciais, sobrepeso, ginecomastia e testículos pequenos. Esta duplicação segundo Rio et al., (2010) não era visível na análise cromossômica comum. Segundo Hickey et al. (2013) duplicação em Xq27.3-q28 é responsável por uma síndrome de hipogonadismo hipogonadotrófico, ginecomastia, deficiência intelectual, baixa estatura e obesidade.

A CNV observada neste trabalho possui tamanho e genes semelhantes a observada por Rio et al (2010) e é menor do que a observada por Hickey et al. (2013). Ambos identificaram um fenótipo muito semelhante nos indivíduos estudados nos respectivos trabalhos, no entanto o presente trabalho observou um fenótipo mais ameno comparado aos descritos, o que pode sugerir que os demais fenótipos não compartilhados podem estar sendo causados por outros fatores, ou o mais provável é que estes fenótipos tenham uma expressividade variável.

6.6.5 Caso 6: Indivíduo 1340

Um menino com um ano e meio de idade cujo fenótipo é ADNPM, baixo peso, dificuldade motora, sem dismofias de face, porém com baixa implantação e mal formação das orelhas (que são rudimentares com o pavilhão auricular malformado), atresia de coanas, atresia no esôfago com fístula gastroesofágica e cariótipo normal, porta uma microduplicação de 200Kb em 20q13.33, posição genômica 61,854,236-62,054,955 (Tabela 7). Esta região aparece em frequentes deleções no DGV. No Banco de dados DECIPHER há principalmente duplicações patogênicas, porém maiores que a região duplicada no menino. Há 10 genes nesta região, vários dos quais codificando para canais iônicos. Um gene com possível implicação é o *BIRC7* (*Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing*) conhecido como Livin. Ele codifica um membro da família de inibidores de apoptose (IAP), sendo um regulador apoptótico capaz de exercer atividades pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Desempenha um papel crucial na proliferação celular e no controle do ciclo celular, através da inibição ou degradação de caspases, pois

apresenta também funções de ubiquitina ligase. Super-expressão de BIRC7 é detectada no processo inicial e progressão de câncer (YAN et al, 2011).

6.7 Taxa Diagnóstica e Relação dos Fenótipos com Diagnóstico

Este estudo obteve uma taxa diagnóstica de ~25% (dos 109 indivíduos, 28 apresentaram CNVs consideradas causais). Em um estudo realizado por Xiang et al. (2010), com a participação de 1499 indivíduos afetados, o diagnóstico foi obtido em 12%; a matriz de CGH *array* utilizada foi a 44k da Agilent (Santa Clara, CA). Outro estudo analisou 246 indivíduos com desordens do desenvolvimento utilizando as matrizes de CGH *array* BAC e 44k da Agilent, obteve uma taxa diagnóstica de 29,7%, mais alta do que as observadas em diferentes estudos provavelmente devido a um possível viés na seleção de pacientes (ROSELLÓ et al, 2014). Um trabalho utilizando as matrizes de CGH *array* de 44k e 180k, ambas da da Agilent, em 115 indivíduos obteve uma taxa diagnóstica de 19% (CHONG et al, 2014). Já Bartnik et al. (2014) obteve diagnósticos em 33% dos casos utilizando o CGH *array* como primeira técnica diagnóstica.

A melhoria no rendimento diagnóstico em exames de CGH *array* pode também ser atribuída a uma maior resolução de *arrays* de oligonucleotídeos e maior cobertura genômica das plataformas contribuindo para uma taxa de detecção superior.

A taxa diagnóstica para os 42 indivíduos com DI do presente estudo foi de ~43%, muito acima do encontrado por Beudet (2013), que revisou o assunto e afirma que há maior probabilidade de encontrar CNVs patogênicas em indivíduos com DIM, DIS associadas a características dismórficas, onde obteve diagnóstico de 20%-25% com CGH *array*. No entanto, no presente estudo foram considerados também os indivíduos com DIL, excluídos da análise feita por Beudet, o que demonstra que a taxa diagnóstica não diminui quando são considerados também os indivíduos com DIL.

A relevância de utilizar CGH *array* em casos de DIL é evidenciada pelas frequências diagnósticas que são obtidas em vários trabalhos. Nos 20 indivíduos que apresentaram DIL no presente trabalho, CNVs raras foram encontradas em 10 (50%), metade dos quais não apresentava dismorfias. Em comparação, a taxa diagnóstica encontrada para DIM (4 de 16) foi de 25% e para DIS (4 de 6) foi de 67% (Tabela 9). O alto percentual de diagnóstico da DIS pode ser um artefato de um número muito pequeno de indivíduos para quais o teste foi solicitado.

Dados obtidos por Anselmi (2013), que estudou 122 amostras de indivíduos testados no mesmo laboratório um ano antes, porém com plataformas de menor resolução (Agilent 44K e 60K) apresentou taxa diagnóstica de 46,5% para DIL, 13 de 28 testados, (58% para DIL com dismorfologias e 22% para DIL sem dismorfologias); 17,5% para indivíduos com DIM (7 de 40) e 33,5% em 6 de 18 indivíduos com DIS.

Outros estudos também observam a mesma quantidade (Wincent et al., 2011) ou maior de alterações causais em indivíduos com DIL quando comparados aos graus de deficiência mais graves. Trabalho

recente realizado com 66 indivíduos com DIL, identificou 24 CNVs não polimórficas em 20 indivíduos (~30%) com o auxílio da plataforma de CGH *array* de 180K da Agilent Technologies (COUTTON et al, 2014). Beaudet (2013) afirma que mais recentemente, as amostras derivadas de CGH *array* que estão aparecendo com maior frequência são provenientes de crianças com deficiência intelectual leve, fenótipos relacionados com autismo leve, epilepsia idiopática e hiperatividade, o que também é corroborado pelos dados obtidos no presente estudo, onde foram solicitados exames para 40 indivíduos com DIL comparados a 16 para DIM e apenas 6 para DIS. Entre o total dos 109 exames analisados, 54% dos indivíduos não apresentavam dismorfologias. Nas solicitações realizadas apenas um ano antes, a proporção era maior para DIM (40 pacientes), porém já demonstrava uma tendência a incluir muitos pacientes com DIL (28), para DIS foram 18 solicitações (ANSELM, 2013).

É extremamente importante observar os dados com relação a DIL, que dentre as deficiências intelectuais é da qual menos se conhece as causas. Historicamente a DIL tem sido creditada a causas multifatoriais (ambientais) em contraposição as orgânicas (COUTTON et al., 2014), uma vez que se trata de uma condição mais sutil muitas vezes envolvendo alterações pequenas, não sendo visíveis no cariótipo convencional. Agora, com o surgimento de testes mais refinados se está descobrindo que deleções e duplicações são causas importantes de patogenicidade para patologias consideradas uma incógnita para os pesquisadores. O presente trabalho corrobora com estas considerações e acrescenta mais dados.

Com relação ao autismo (sem DI) classificado de acordo com o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-IV), ou seja, não incluindo os indivíduos com deficiência intelectual, que seriam classificados em outro eixo, observamos uma taxa diagnóstica de 9,5% (Tabela 9) com CGH *array*. Shen et al. (2010) em seu estudo com 933 indivíduos com transtorno do espectro autista observou uma taxa de 18,2%. De acordo com Beaudet (2013) a taxa diagnóstica dos casos de autismo fica entre 5% a 10%, similar ao observado aqui. Se juntarmos a taxa diagnóstica encontrada em pessoas que apresentaram algum grau de comprometimento intelectual com ou sem autismo (42,8%), com as que apresentam autismo sem DI (9,5%) temos um total de 52,3%, dado superior ao observado por Roberts et al. (2014) em seu trabalho com 215 indivíduos com transtorno do espectro autista e/ou dificuldade intelectual, cujo rendimento diagnóstico foi de 21%.

Os médicos frequentemente desejam saber qual o percentual de crianças com determinados fenótipos que terão anormalidades genéticas causais detectadas por CGH *array*. Esta é uma dúvida recorrente, em que casos solicitar tal exame? A resposta a esta questão depende de muitas variáveis e, portanto, não é tão simples de se obter.

No entanto os dados desse estudo ajudam nesse sentido, indicando que em casos onde há ADNPM, DI de diferentes graus, dismorfias de cabeça/face e autismo é válido fazer o pedido de CGH *array* como opção de teste de primeira linha, o que também é defendido por diversos pesquisadores, (MILLER et al., 2010; BEAUDET, 2013; BATTAGLIA et al., 2013). As chances de se obter um diagnóstico genético específico são grandes, o que facilitaria a assistência médica

adequada, aconselhamento genético específico para a família e, em última instância, uma melhor condição de vida para o próprio paciente.

7. CONCLUSÕES

* A taxa diagnóstica encontrada neste estudo (~25%) demonstra que o CGH *array* está se tornando um método diagnóstico bastante eficiente para estudar a causa genética de distúrbios do desenvolvimento.

*As principais indicações que levam os médicos a solicitarem o exame de CGH *array* são o ADNPM, dismorfias, principalmente as de cabeça e face e, em seguida, a DI em diferentes graus, e a presença de autismo (com e sem DI). Com relação aos fenótipos que obtiveram maior taxa de diagnósticos destaca-se efetivamente a deficiência intelectual de qualquer grau, que neste contexto revelou ~40% de resultados causais ou provavelmente causais; a presença de dismorfologias e a hiperatividade associada a morbidade.

*A alta taxa diagnóstica obtida particularmente para DIL (50%) é talvez o resultado mais surpreendente e de aplicabilidade clínica imediata.

* A taxa diagnóstica para autismo, sem deficiência intelectual, foi de 9,5%, apresentando o CGH *array* como um importante método de diagnóstico, inclusive para verificar eventual hereditariedade e aconselhamento genético.

* De um total de 276 CNVs encontradas, cerca de 81% são benignas, 12% são patogênicas (26) ou potencialmente patogênicas (6) e 20 alterações, cerca de 7%, permanecem no limbo de significado clínico incerto, tornando o trabalho de quem analisa os dados de CNVs uma verdadeira tarefa de detetive, uma procura árdua por evidências na esperança de encontrar o culpado pela situação.

* Os cromossomos menos propensos a terem CNVs foram o 19 e o 21, e os menos propensos a terem CNVs raras foram os cromossomos 10 e Y.

* Os casos que apresentaram CNVs potencialmente patogênicas foram discutidos mais detalhadamente e foi possível confirmar em um deles que a haploinsuficiência do gene *MITF* é responsável pelo fenótipo de surdez. Em outro caso verificou-se a expressividade variável dos fenótipos de indivíduos que apresentam a microduplicação em Xq27.3-q28; além de salientar os genes *GABRR1*, *GABRR2*, *ANKRD6*, *PMP2*, *SNX16*, *CHMP4C*, *IMPA1*, *FMR1* e *BIRC7* como genes candidatos a patológicos, que devem ser observados com mais cuidado em análises futuras, até que se estabeleça ou descarte seu papel na etiologia das condições onde estiveram alterados.

8. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES

O CGH array ainda é considerado um exame de alto custo, em torno de 3 mil dólares, fato que tende a diminuir nos próximos anos dada a velocidade com que as tecnologias avançam e barateiam. No estado de Santa Catarina o SUS disponibiliza por mês 7 exames de CGH array,

sendo que a fila de espera hoje para quem entra para realizar este exame é de cerca de 2 anos. Um tempo longo se considerarmos que as condições estudadas neste trabalho estão ligadas ao neurodesenvolvimento do indivíduo e que este espaço de tempo pode ser determinante para eventual intervenção. O presente estudo corrobora a importância deste exame no diagnóstico de distúrbios do desenvolvimento e considera importante inserir o CGH array junto aos programas de saúde pública como um teste de primeira linha, com um aumento do oferecimento do mesmo através do SUS.

Como, apesar de amplamente aplicado, ainda se trata de uma metodologia incipiente, o CGH array é uma ferramenta poderosa para a identificação de CNVs ou genes que influenciam o desenvolvimento.

Em conclusão o CGH *array* é um importante método para diagnosticar doenças raras, como DI, proporcionando diagnóstico etiológico para muitas condições até então de etiologia desconhecida. Isto é importante para fins de aconselhamento genético, cálculo do risco de recorrência e para atribuir possíveis diagnósticos pré-natais e assim proporcionar abordagens preventivas/paliativas para a família e para o indivíduo.

9. REFERÊNCIAS

AAIDD – American Association on Intellectual and Developmental Disabilities. **Definition of Intellectual Disability**. Disponível em: <<http://www.aamr.org>>. Acesso em: Outubro, 2014.

ACOSTA, Maria T; et al. **Cognitive Profiles of Neurofibromatosis Type 1 Patients With Minor Brain Malformations**. *Pediatric neurology*, 46(4):231-234; 2012.

AFFYMETRIX. **The unrivaled standard in cytogenetics**. Disponível em: <<http://www.affymetrix.com/estore/>> Acesso em: Setembro, 2014.

AHN, Joo Wook; et al. **A new direction for prenatal chromosome microarray testing**: software-targeting for detection of clinically significant chromosome imbalance without equivocal findings. *PeerJ*, 22(2):e354; 2014.

ALBERTS, Bruce; et al. **Biologia Molecular da Célula** 5ed. Artmed, 2009.

ALLACHE, Redouane; et al. **Genetic studies of ANKRD6 as a molecular switch between Wnt signaling pathways in human neural tube defects**. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. Sep 8; 2014.

ANSEMI, Mayara. **Resultados Obtidos de uma Amostra de Pacientes Estudados por Hibridização Genômica Comparativa por Chips de Oligonucleotídeos (CGH array) em Santa Catarina**: análise dos fatores: indicação, taxa diagnóstica e aplicabilidade. 2013.

APA - American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV.4** ed. Arlington, VA: Artmed, 2010.

APA - American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-V.5** ed. atual. Arlington, VA: Artmed, 2013.

ARMATAS, V. **Mental retardation: definitions, etiology, epidemiology and diagnosis.** Journal of Sport and Health Research. 1(2):112-122; 2009.

BALASUBRAMANIAN, Bhanumathi; BHATT, Chetna V; GOYEL, Neelam A. **Genetic studies in children with intellectual disability and autistic spectrum of disorders.** Indian J Hum Genet, 15(3): 103–107; 2009.

BARTNIK, Magdalena; et al. **Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability.** J Appl Genet. 55(1):125-44; 2014.

BARTNIK, Magdalena; et al. **The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children.** Dev Period Med, 18(3):307-17; 2014.

BATTAGLIA, Agatino; et al. **Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features.** Eur J Paediatr Neurol. 17(6):589-99; 2013.

BEAUDET, Arthur L. **The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics.** Child Dev, 84(1):121-32; 2013.

BEJJANI, Bassen A; SHAFFER, Lisa G. **Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics.** Annu Rev Genomics Hum Genet, 9(1):71–86; 2008.

BENJAMIN, Sheldon; LAUTERBACH Margo D; STANISLAWSKI Aimee L. **Congenital and Acquired Disorders Presenting as Psychosis in Children and Young Adults.** Child Adolesc Psychiatr Clin N Am, 22(4): 581-608; 2013.

BERG, Jonathan S; et al. **Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region.** Genet Med. 9(7):427-41; 2007.

BISSAR-TADMOURI, Nesrine; et al. **X chromosome exome sequencing reveals a novel ALG13 mutation in a nonsyndromic intellectual disability family with multiple affected male siblings.** American Journal of Medical Genetics Part A, 164(1):164-169; 2014.

BOKHOVEN, Hans van. **Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities.** Annu Rev Genet. 45:81-104; 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Censo Demográfico 2010** Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: Setembro, 2014.

CARLSON, Josh J; et al. **Economic analyses of human genetics services: A systematic review.** Genetics in Medicine, 7(8):519–523; 2005.

CARLTON, Jeremy G; et al. **ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C.** Science. 13;336(6078):220-5; 2012.

CARLTON, Jeremy G; MARTIN-SERRANO, Juan. **The ESCRT machinery: new functions in viral and cellular biology.** Biochem Soc Trans. 37(Pt 1):195-9; 2009.

CHANG, Li-Jung; et al. **An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening.** Clin Exp Reprod Med, 38(3):126-34; 2011.

CHAO, Hsiao-Tuan; et al. **Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes.** Nature. 468(7321):263-9; 2010.

CHELLY, Jamel et al. **Genetics and pathophysiology of mental retardation.** Eur J Hum Genet. (6):701-13; 2006.

CHEUNG, Sau W; et al. **Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics.** Am J Med Genet A, 143(1686):1679–1686; 2007.

CHONG, Wilson Wai Sing; et al. **Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism, and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort.** *Mol Cytogenet.* 23;7:34; 2014.

CHRISTIAN Mildred S. **Introduction/Overview: Gender-Based Differences in Pharmacologic and Toxicologic Responses.** *Int J Toxicol.* 20(3):145-8; 2001.

CLIMENT, J.; et al. **Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization.** *Biochem Cell Biol.* 85(4):497-50; 2007.

COGHLAN, S; et al. **GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms.** *Neurosci Biobehav Rev.* 36(9):2044-55; 2012.

CONRAD, Donald F; et al. **Origins and functional impact of copy number variation in the human genome.** *Nature,* 1;464(7289):704-12; 2010.

COUTTON, Charles; et al. **Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study.** *Eur J Pediatr.* Jul 3; 2014.

CRONIN, Simon; et al. **Analysis of genome-wide copy number variation in Irish and Dutch ALS populations.** *Hum Mol Genet,*17(21):3392-8; 2008.

CRYNS, Kim; et al. **IMPA1 is Essential for Embryonic Development and Lithium-Like Pilocarpine Sensitivity.** *Neuropsychopharmacology.* 33(3):674-84; 2008.

CUTTING, Garry R; et al. **Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) P1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(7):2673-7; 1991.

CUTTING, Garry R; et al. **Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1**

(GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics*. 12(4):801-6; 1992.

D'AMBROSIO, Valentina; et al. **Role of CGH array in the diagnosis of autosomal recessive disease:** a case of Ellis-van Creveld syndrome. *Prenat Diagn*, 2014.

DARILEK, Sandra; at al. **Pre and postnatal genetic testing by arraycomparative genomic hybridization:** genetic counseling perspectives. *Genet Med*, 10(1):13–18; 2008.

DAVE, U; SHETTY, N; MEHTA, L. **A community genetics approach to population screening in India for mental retardation** – A model for developing countries. *Annals of Human Biology*, 32, 195–203; 2005.

Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010.** *MMWR Surveill Summ*. 63(2):1-21; 2014.

DE VRIES, B. B. A. et al. **Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements:** a checklist. *Journal of Medical Genetics*, 38(3):145–150; 2001.

DE VRIES, B. B. A. **Telomeres:** a diagnosis at the end of the chromosomes. *Journal of Medical Genetics*, 40(6):385–398; 2003.

DETH, Richard C. **Genomics, intellectual disability, and autism.** *N Engl J Med*. 7;366(23):2231-2; 2012.

EDGER Patrick P; PIRES Chris J. **Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes.** *Chromosome Res*.17(5):699-717; 2009.

EVANGELIDOU, Paola; et al. **Implementation of High Resolution Whole Genome Array CGH in the Prenatal Clinical Setting:** Advantages, Challenges, and Review of the Literature. *Biomed Res Int*, 2013:346762; 2013.

FERLINI, Alessandra; et al. **Custom CGH array profiling of copy number variations (CNVs) on chromosome 6p21.32 (HLA locus) in patients with venous malformations associated with multiple sclerosis.** BMC Medical Genetics, 11:64; 2010.

FEUK, Lars; CARSON, Andrew R; SCHERER, Stephen W. **Structural variation in the human genome.** Nat Rev Genet, 7(2):85-97; 2006.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. **Deficiência Mental.**
Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/>>.
Acesso em: Setembro, 2014.

FIORENTINO F; et al. **Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles.** Hum Reprod. 2014.

FLINT, Jonathan; KNIGHT, Samantha. **The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation.** Curr Opin Genet Dev, 13(3):310-6; 2003.

GIJSBERS, A. C. J.; SCHOUMANS, J.; RUIVENKAMP, C. A. L. **Interpretation of array Comparative Genome Hybridization data: a major challenge.** Cytogenetic and Genome Research, 135(4-5):222-227; 2011.

GIRIRAJAN Santhosh; et al. **Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants.** N Engl J Med. 367(14):1321-31; 2012.

GOLDENBERG, A; SAUGIER-VEBER, P. **Genetics of mental retardation.** Pathologie-biologie, 58(5): 331-342; 2010.

GREENBERG, Jan S; et al. **Family Environment and Behavior Problems in Children, Adolescents, and Adults with Fragile X Syndrome.** American journal on intellectual and developmental disabilities, 117(4): 331-346; 2012.

GRILL Christine; et al. **MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function.** *Hum Mol Genet.* 22(21):4357-6; 2013.

HARRIS, James C. **Intellectual disability:** Understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment. New York: Oxford University Press. pp 42-98; 2006.

HICKEY, Scott E; et al. **Duplication of the Xq27.3–q28 region, Including the FMR1 Gene, in an X-Linked Hypogonadism, Gynecomastia, Intellectual Disability, Short Stature, and Obesity Syndrome.** *Am J Med Genet A.* 161A(9):2294-9; 2013.

HILLMAN, S. C; et al. **Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis.** *Ultrasound Obstet Gynecol,* 37(1):6-14; 2011.

HOGART, Amber; et al. **The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13.** *Neurobiol Dis.* 38(2):181-91; 2010.

IAFRATE, John A; et al. **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nature Genetics,* 36:949 – 951; 2004.

INLOW Jennifer K; RESTIFO Linda L. **Molecular and comparative genetics of mental retardation.** *Genetics,* 166(2):835-81; 2004.

JELLIFFE-PAWLOWSKI, Laura.L. et al. **Risk of Mental Retardation Among Children Born With Birth Defects.** *Arch Pediatr Adolesc Med.*157:545-550; 2003.

KALLIONIEMI, Anne. **CGH microarrays and câncer.** *Curr Opin Biotechnol,* 19(1):36-40; 2008.

KALLIONIEMI, Anne; et al. **Comparative Genomic Hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.** *Science,* 258(5083):818-821; 1992.

KARR, Valerie L. **A Life of Quality: Informing the UN Convention on the Rights of Persons With Disabilities.** Journal of Disability Policy Studies, 22: 67; 2011.

KATOH, Masuko; KATOH, Masaru. **Identification and characterization of rat Ankrd6 gene in silico.** Int J Mol Med. 15(2):359-63; 2005.

KAUFMAN, Liana; AYUB, Muhammad; VINCENT, John B. **The genetic basis of non syndromic intellectual disability: a review.** Journal of neurodevelopmental disorders, 2(4):182-209; 2010.

KHARBANDA Mira; TOLMIE John; JOSS Shelagh. **How to use...microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders.** Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2014-306022; 2014.

LEE, Charles; IAFRATE, John A; & BROTHMAN, Arthur R. **Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders.** Nature Genetics, 39(7):48-54; 2007.

LEILEI, Zhang; et al. **SNX16 negatively regulates the migration and tumorigenesis of MCF-7 cells.** Cell Regeneration 2:3; 2013.

LEONARD, Helen; WEN Xingyan. **The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium.** Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 8:117-34; 2002.

MAKANAE, Koji; et al. **Identification of dosage-sensitive genes in Saccharomyces cerevisiae using the genetic tug-of-war method.** Genome Res. 23(2):300-11; 2013.

MARIS, Angelica Francesca; TROTT, Alexis. **A patogênese genética e molecular da síndrome de Angelman.** J Bras Psiquiatr, 60(4):321-30; 2011.

MARIS, Angelica Francesca; et al. **Gender effects of acute malathion or zinc exposure on the antioxidant response of rat hippocampus and cerebral cortex.** Basic Clin Pharmacol Toxicol, 107(6):965-70; 2010.

MAULIK Pallab K. et al. **Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies.** Res Dev Disabil. 32(2):419-36; 2011.

MAZUR, Pawel K; et al. **SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer.** Nature. 510(7504):283-7; 2014.

MEFFORD, Heather C; BATSHAW, Mark L; HOFFMAN, Eric P. **Genomics, Intellectual Disability, and Autism.** N Engl J Med.366(8):733-43; 2012.

MILLER, David T; et al. **Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.** American Journal of Human Genetics, 86(5):749–764; 2010.

MOHAPATRA, Gayatri; et al. **Array CGH in brain tumor.** Array Comparative Genomic Hybridization: Protocols and Applications, 973:325–338, 2013.

MORAES, Ana Maria S. M; MAGNA, Luís Alberto; MARQUES-DE-FARIA, Antonia Paula. **Prevenção da deficiência mental: conhecimento e percepção dos profissionais de saúde.** Cad. Saúde Pública, 22:(3) 685-690; 2006.

OHNISHI, T; et al. **Defective craniofacial development and brain function in a mouse model for depletion of intracellular inositol synthesis.** J Biol Chem. 11;289(15):10785-96; 2014.

POLAN, Michelle B; et al. **Neurodevelopmental disorders among individuals with duplication of 4p13 to 4p12 containing a GABAA receptor subunit gene cluster.** Eur J Hum Genet. 22(1):105-9; 2014.

RAUCH, A. et al. **Molecular karyotyping using an SNP array for genome wide genotyping.** Journal of Medical Genetics, 41(12):916-922; 2004.

REJEB, Imen; JEMAA, Lamia Ben; CHAABOUNI, Habiba. **X Linked Mental Retardation.** La tunisie Medicale, 87 (05) 311-318; 2009.

RIO, Marlène; et al. **Familial interstitial Xq27.3q28 duplication encompassing the FMR1 gene but not the MECP2 gene causes a new syndromic mental retardation condition.** *Eur J Hum Genet.* 18(3):285-90; 2010.

ROBERTS, Jennifer L; et al. **Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services.** *Gene.* 1;535(1):70-8; 2014.

ROBINSON Arthur; LINDEN Mary G. **Clinical Genetic Handbook.** Scientific Publications. Boston, Blackwell, 1993.

RODAL, Avital A; et al. **A presynaptic endosomal trafficking pathway controls synaptic growth signaling.** *J Cell Biol.* 4;193(1):201-17; 2011.

ROGOWSKI, W. **Genetic screening by DNA technology: A systematic review of health economic evidence.** *Int J Technol Assess Health Care,* 22(3):327-37; 2006.

ROPERS, Hans Hilger. **Genetics of Early Onset Cognitive Impairment.** *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 11:161-87; 2010.

ROSELLÓ, Mónica et al. **Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations.** *Eur J Paediatr Neurol.* (18): 558-66; 2014.

SANDERS, Stephan J; et al. **Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism.** *Neuron,* 9;70(5):863-85; 2011.

SANDLER Thomas W. **The embryologic origin of ventral body wall defects.** *Semin Pediatr Surg.*19(3):209-14; 2010.

SCHALOCK, Robert L. et al. **Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports.** 11. Ed. Washington, DC: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, 2010.

SCHOUTEN, Jan P; et al. **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Research*, 30(12):57; 2002.

SHAFFER, Lisa G. **American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation.** *Genet Med.* 7(9):650-4; 2005.

SHAIKH, Tamim H; et al. **High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: A data resource for clinical and research applications.** *Genome Research*, 19 1682–1690; 2009.

SHEN, Yiping; et al. **Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders.** *Pediatrics*.125(4):e727-35; 2010.

SHINAWI, Marwan; CHEUNG, Sal Wai. **The array CGH and its clinical applications.** *Drug Discov Today*, 17-18:760-70; 2008.

SHOICHET, Sarah; et al. **Identification of candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis by array comparative genomic hybridization.** *Amyotroph Lateral Scler*, 10(3):162-9; 2009.

SHOUKIER, M; et al. **Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants?** *Clinical Genetics*, 83(1):53–65; 2013.

SIGGBERG, Linda; et al. **Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients.** *Am J Med Genet A*, 152A(6):1398-410; 2010.

SIMONS, Annet; et al. **Genome-Wide Arrays in Routine Diagnostics of Hematological Malignancies.** *Hum Mutat*, 33(6):941-8; 2012.

SOMERVILLE, Martin J; et al. **Severe Expressive-Language Delay Related to Duplication of the Williams–Beuren Locus.** *N Engl J Med.* 20;353(16):1694-701; 2005.

STANKIEWICZ, Pawel; BEAUEDT, Arthur L. **Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation.** *Curr Opin Genet Dev*, 17(3):182-92; 2007.

STANKIEWICZ, Pawel; PURSLEY, Amber. N; CHEUNG, Sau Wai. **Challenges in clinical interpretation of microduplications detected by array CGH analysis.** *Am J Med Genet A*, 152A(5):1089-100; 2010.

STEVENSON, Roger E. et al. **X-Linked Mental Retardation.** Oxford, UK: Oxford University Press; 2000.

The Wellcome Trust Case Control Consortium. **Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls.** *Nature*. 1;464(7289):713-20; 2010.

THIENPONT, Bernard; et al. **Duplications of the critical Rubinstein-Taybi deletion region on chromosome 16p13.3 cause a novel recognisable syndrome.** *J Med Genet*. 47(3):155-61; 2010.

TORNIERO, Claudia; et al. **Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe expressive-language delay in patients with duplication of the Williams–Beuren locus.** *Eur J Hum Genet*. 15(1):62-7; 2007.

TRASK, Barbara J. **Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping.** *Trends in Genetics*, 7(5):149-154; 1991.

TURHEIMER, Federico E; et al. **The X-Linked Hypothesis of Brain Disorders: Can Gender Ratios Tell Us Anything About Cellular Etiology of Neurodegenerative and Psychiatric Diseases?** *Neuroscientist*. 2014.

TURNPENNY Peter; ELLARD Sian. **Genética Médica.** Tradução da 13ª edição, Rio de Janeiro, Elsevier. 2009.

VASSON, Aurélie; et al. **Custom oligonucleotide array-based CGH: a reliable diagnostic tool for detection of exonic copy-**

number changes in multiple targeted genes. *Eur J Hum Genet*, 21(9):977-87; 2013.

VENGOECHEA Jaime; et al. **De novo microduplication of the FMR1 gene in a patient with developmental delay, epilepsy and hyperactivity.** *Eur J Hum Genet*. 20(11):1197-200; 2012.

VETRO, Annalisa; et al. **The Introduction of Arrays in Prenatal Diagnosis: A Special Challenge.** *Hum Mutat*, 33(6):923-9; 2012.

XIANG, Bixia; et al. **Genome-Wide Oligonucleotide Array Comparative Genomic Hybridization for Etiological Diagnosis of Mental Retardation.** *J Mol Diagn*. 12(2):204-12; 2010.

XU, Jie; CHEN, Zhong. **Advances in Molecular Cytogenetics for the Evaluation of Mental Retardation.** *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 117C(1):15-24; 2003.

WINCENT, J; et al. **High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting.** *Clin Genet*. 79(2):147-57; 2011.

WU, Gang; et al. **Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural [correction of neural] tube defects.** *J Biomed Sci*. 24;18:66; 2011.

YAN, Biao. **Research progress on Livin protein: an inhibitor of apoptosis.** *Mol Cell Biochem*. 357(1-2):39-45; 2011.

ZHANG, Hua; et al. **Functional analysis of MITF gene mutations associated with Waardenburg syndrome type 2.** *FEBS Lett*. 586(23):4126-3; 2012.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Página 1 de 1



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 015/2014

NOME DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO, TAXA DIAGNÓSTICA E APLICABILIDADE DE EXAMES DE HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA POR CHIPS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS (CGH array) EM SANTA CATARINA	
PESQUISADORA: Mayara Anselmi / Nathacha Barreto	
ORIENTADORA: Angelica Francesca Maris	
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG	
DATA DO PARECER: 14/08/2014	REGISTRO NO CEP: 015/2013
GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: Grupo III – 2.02	

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Infantil Joana de Gusmão (CEP-HIJG), em reunião ordinária realizada em 14 de agosto de 2014, aprovou as solicitações abaixo listadas, referentes ao Protocolo de Pesquisa 015/2013, aprovado conforme parecer 019/2013, deste Comitê.

- Prorrogação do prazo de coleta de dados, por seis meses, a partir desta data;
- Inclusão do nome da pesquisadora Natacha Barreto.

Lembramos que conforme Resolução 466/2012, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No *site*: www.saude.sc.gov.br/hijg/CEP.htm, está disponibilizado modelo.

Qualquer alteração a este projeto de pesquisa aprovado deverá ser comunicada ao CEPHIJG.


 Dra. Jucélia Maria Guedert
 Secretária Executiva do
 CEP - HIJG
 Vanessa Borges Platt

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 30 de julho de 2014.
 e-mail: cephiig@saude.sc.gov.br



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 019/2013

NOME DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO, TAXA DIAGNÓSTICA E APLICABILIDADE DE EXAMES DE HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA POR CHIPS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS (CGH array) EM SANTA CATARINA	
PESQUISADORA: Mayara Anselmi	
ORIENTADORA: Angelica Francesca Maris	
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG	
DATA DO PARECER: 04/04/2013	REGISTRO NO CEP: 015/2013
GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: Grupo III – 2.02	

DOCUMENTOS SOLICITADOS	SITUAÇÃO
1.FOLHA DE ROSTO	OK
2.PROJETO DE PESQUISA	OK
3.CURRÍCULO DO PESQUISADOR	OK
4.CARTA DE ENCAMINHAMENTO AO CEP	OK
5.TERMO DE COMPROMISSO ÉTICO	OK
6.CONCORDÂNCIA DO SERVIÇO	OK
7. SUMÁRIO DO PROJETO DE PESQUISA	OK
8. DECLARAÇÃO ASSINADA PELA DIREÇÃO DO HIJG	OK
9. FÓRMULÁRIO DE AVALIAÇÃO ECONÔMICO FINANCEIRA	ISENTO
10.DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO E ENTREGA DE RELATÓRIO FINAL	OK

OBJETIVOS

Geral: Relacionar os resultados obtidos nos exames de CGH array solicitados através do Laboratório Neurogene, em pacientes indicados por médicos do Estado de Santa Catarina, no período de 5 anos, para verificar se há padrões distintos entre as diferentes indicações clínicas que levaram a solicitação

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.
 e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

(distúrbios do desenvolvimento como deficiência intelectual idiopática e autismo) com resultados positivos ou negativos em exames de CGH *array* em pacientes cuja investigação prévia por cariótipo não esclareceu a etiologia de sua condição.

Específicos:

- Utilizando dados de arquivo do Laboratório Neurogene, analisar os resultados obtidos pela investigação de pacientes através da técnica da hibridização genômica comparativa por *arrays*, CGH *array*, nos aproximadamente 200 exames solicitados desde 2008 até dezembro de 2012 através do referido laboratório, quanto a(s):
- Taxa de resultados positivos, onde o CGH *array* revelou ou contribuiu para a compreensão da etiologia da patologia do paciente;
- Principais indicações clínicas que levaram aos médicos solicitarem o exame investigativo por CGH *array*;
- Eventuais diferenças na taxa diagnóstica entre pacientes com certas indicações clínicas com ou sem traços dismórficos ou síndromas marcantes;
- Tipo de alteração encontrada;
- Comparar as taxas diagnósticas e indicações feitas pelos médicos catarinenses com relatos da literatura internacional (PUBMED), observar se a plataforma utilizada está adequada para as diversas indicações clínicas.

SUMÁRIO DO PROJETO

Trata-se de um estudo retrospectivo, cuja amostra se compõe de aproximadamente 200 exames de CGH *array*, solicitados desde 2008 até dezembro de 2012, através do SUS, convênios médicos, como UNIMED, ou particular, via o Laboratório Neurogene. As pesquisadoras entrarão em contato com os médicos geneticistas e/ou neuropediatras verificando o interesse dos mesmos em participar da pesquisa (assinaram um TCLE). Esses médicos acionam o laboratório que executou os exames no período de 2008 a 2012. O laboratório passará diretamente os resultados dos exames aos médicos solicitantes que, com base neles, responderão ao questionário proposto após pesquisar as informações nos prontuários. Os nomes dos pacientes não serão mencionados, mantendo assim a confidencialidade e sigilo.

CEP- HIIG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cepkihig@saude.sc.gov.br

JUSTIFICATIVA

Sendo o CGH *array* um método que possibilita uma análise refinada de todo o genoma, sem necessitar de hipótese diagnóstica prévia, esta se tornou uma ferramenta de extremo interesse para a investigação de casos idiopáticos (de causa desconhecida) de distúrbios do desenvolvimento. Considerando o seu valor clínico, o presente trabalho pretende investigar como o CGH *array* tem auxiliado o diagnóstico e a identificação das bases moleculares de casos de autismo, deficiência mental idiopática e atraso no desenvolvimento em Santa Catarina, e se a taxa diagnóstica nos exames solicitados no Estado é semelhante ao relatado na literatura. Adicionalmente pretendemos verificar se há diferenças na taxa diagnóstica entre pacientes que apresentam traços dismórficos e aqueles que não apresentam dismorfologias marcantes. Critério importante para decidir quando pedir este exame e com dados conclusivos a este respeito na literatura internacional até então. Assim, pretendemos que através desse estudo de avaliação da indicação clínica, taxa diagnóstica e aplicabilidade do exame de CGH *array*, de alto custo no momento, e possamos colaborar para a intensificação de pesquisas sobre o tema e para que novas diretrizes de saúde pública sejam consideradas.

METODOLOGIA

1. DELINEAMENTO – Estudo transversal com coleta retrospectiva de dados.
2. CÁLCULO E TAMANHO DA AMOSTRA – Por possibilidade, dados de todos pacientes aos quais foi solicitado o CGH *array*.
3. PARTICIPANTES DE GRUPOS ESPECIAIS – Menores de 18 anos, portadores de atraso mental.
4. RECRUTAMENTO – pacientes atendidos por geneticistas e / ou neuropediatras em diferentes locais e que fizer o exame no Laboratório Neurogene.
5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO – Não explicitamente descritos.
6. PONDERAÇÃO ENTRE RISCOS – BENEFÍCIOS – Sim, na justificativa de não obtenção do TCLE
7. USO DE PLACEBO – Não
8. MONITORAMENTO DA SEGURANÇA DOS DADOS – Somente pessoas diretamente relacionadas à pesquisa deverão ter acesso aos dados.
9. AVALIAÇÃO DOS DADOS – Adequada.
10. PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE – Adequadas.
11. PREOCUPAÇÃO COM OS ASPECTOS ÉTICOS – SIM
12. CRONOGRAMA – Adequado.

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agrônoma, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular n° 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

13. PROTOCOLO DE PESQUISA – OK
 14. ORÇAMENTO – Adequado.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) – Adequado*

No momento da realização dos exames os pacientes / familiares assinaram um TCLE permitindo a utilização dos resultados dos mesmos para pesquisa.
 Os médicos participantes também assinarão um TCLE.

PARECER FINAL

APROVADO

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 02/05/2013.
- Conforme Resolução 196/92, capítulo III.2.h, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No site: www.saude.sc.gov.br/hijg/CEP.htm, está disponibilizado modelo. Seu primeiro relatório está previsto para NOVEMBRO DE 2013 ou para quando do encerramento da pesquisa.
- Qualquer alteração a este projeto de pesquisa aprovado deverá ser comunicada ao CEPHIJG.

Varêssa Borges Platt
 Dra. Juzeffa Maria Guedert
 Secretária Executiva do
 CEP - HIJG

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.
 e-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

ANEXO B - Termo de Consentimento



NEUROGENE LABORATÓRIO S/S LTDA

Rua Alves de Brito, 346, sala 201- CEP 88015-440
 Centro – Florianópolis – SC
 Fone/Fax: (48)-30281288 (48)-3223-0229 (48)-7812-1130
 www.neurogene.com.br

Termo de Consentimento Informado

Eu, _____
 _____ residente e domiciliado em

 portador do RG: _____ e CPF: _____
 nascido (a) em ____/____/____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade
 em fornecer amostra de sangue minha e/ou de meu (minha) filho (a) para a realização do exame
 de array – CGH.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais
 esclarecimentos quanto as dúvidas por mim apresentadas, Entendo que:

- 1 - O objetivo deste exame é verificar a presença de perdas ou ganhos de material genômico na amostra submetida.
- 2 - O exame é necessário para que uma possível causa da doença genética em questão seja identificada mas não há nenhuma certeza de que a causa seja encontrada.
- 3 - Esse exame não oferece tratamento terapêutico.
- 4 - Este exame não identifica alterações cromossômicas equilibradas, mutações de ponto (gênicas) ou alterações no DNA mitocondrial
- 5 - Se for identificada alguma variante cromossômica não descrita será realizado exame dos pais para comparação, com custo adicional.
- 6 - Embora esse exame seja confiável e realizado com controle de qualidade, pode não ser informativo em alguns casos.

1- Eu _____ autorizo a divulgação no laudo final de todos os resultados identificados no exame, ou seja, **TODOS** os achados genômicos serão divulgados e não somente os relacionados com a clínica do paciente.

2- Eu _____ autorizo a divulgação dos resultados em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.

3 – Eu **NÃO** autorizo a divulgação dos resultados em publicações científicas.

ASSINATURA:-

ANEXO C – Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA DE PACIENTE ENCAMINHADO PARA CGH ARRAY

Número:

Faixa etária do Paciente:

Sexo: Masculino Feminino

Etnia:

Estatura:

Motivo do Encaminhamento:

Resultado Cariótipo Normal Alterado.Qual:Resultado CGHarray Normal Alterado.Qual:Presença conhecida de outros casos na família Sim NãoAtaxia Presente Ausente

Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor (abaixo de 5 anos)

 Presente AusenteAutismo Presente AusenteDificuldade de Aprendizado Sim NãoDeficiência Intelectual Leve Moderada SeveraDificuldade Motora Presente AusenteConvulsões Presente AusenteFrequência: Uma única vez

 Gravidade:

Dismorfias

Face ()Ausente ()Presente
 ()Sutil ()Marcante
 Cabeça ()Ausente ()Presente
 ()Microcefalia ()Macrocefalia ()Outro

Membros()Ausente ()Presente

Qual: _____

Mãos ()Ausente ()Presente
 ()Polidactilia
 ()Braquidactilia
 ()Sindactilia
 ()Outro _____

Pés ()Ausente ()Presente
 ()Polidactilia
 ()Braquidactilia
 ()Sindactilia
 ()Outro _____

Cabelo ()Ausente()Presente

Qual:

Pele ()Ausente()Presente

Qual:

Outras Observações Importantes: