



Universidade de Brasília

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARCELA DIAS HANNA

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY COMO FERRAMENTA PARA A
IDENTIFICAÇÃO DA ETIOLOGIA GENÉTICA DE MALFORMAÇÕES CEREBRAIS
HETEROGÊNEAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Pic-Taylor

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Natália Silva Moretti

BRASÍLIA-DF

2019

MARCELA DIAS HANNA

ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY COMO FERRAMENTA PARA A IDENTIFICAÇÃO DA ETIOLOGIA GENÉTICA DE MALFORMAÇÕES CEREBRAIS HETEROGÊNEAS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 12/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Juliana Mazzeu (Presidente)

Instituição: Universidade de Brasília

Dr. Claudiner Oliveira

Instituição: Hospital de Apoio de Brasília

Prof. Dr. Carlos Nogueira Aucelio

Instituição: Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos pacientes e seus familiares, por concordarem em participar do projeto e permitir a realização deste estudo;

Às professoras Aline Pic-Taylor, Patrícia Moretti e Juliana Mazzeu, pelas instruções e paciência;

Ao Dr Vinícius Montenegro Torres, que encaminhou seus pacientes de Goiânia para participar do projeto;

À equipe do Laboratório de Genética da UnB, que contribuiu com a realização das técnicas utilizadas neste estudo;

Às médicas do HUB, Dra Mara Córdoba, Dra Beatriz Versiani e Dra Rosenelle Araújo, pelos atendimentos dos pacientes no Ambulatório de Genética;

Ao meu professor de piano, Roberto Rufino, que me ajudou a ter um refúgio quando o trabalho acadêmico era muito estressante e contribuiu pra minha autoestima;

À minha psicóloga, Luciana Benigno, por contribuir pra minha autoestima e saúde mental;

À minha família e aos meus amigos, pelo apoio.

À FAP-DF e à CAPES, pelo apoio financeiro.

“Eu tenho que parar em algum lugar, vou deixar alguma coisa pra você imaginar”

(Richard Feynman)

RESUMO

Introdução: As malformações cerebrais são defeitos morfológicos do cérebro causadas por um processo intrinsecamente anormal. Os sintomas apresentados pelos pacientes são bastante variados, dependendo do tipo de malformação e de sua severidade. O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é complexo, envolvendo vários genes que interagem entre si e também envolvendo uma relação com o ambiente. Entre as possíveis causas das malformações cerebrais estão as alterações genéticas. A análise cromossômica por microarray (CMA) detecta principalmente deleções e duplicações no genoma e tem se mostrado uma técnica com alta taxa diagnóstica. Estudos que avaliam a contribuição genética para a formação do SNC são importantes para o melhor entendimento do neurodesenvolvimento como um todo. **Objetivo:** O objetivo geral do presente projeto foi identificar regiões genômicas associadas a malformações cerebrais heterogêneas através da análise de alterações cromossômicas submicroscópicas por CMA, de forma a se estabelecer uma relação genótipo-fenótipo. **Métodos:** A técnica de CMA foi realizada em 21 pacientes com malformações cerebrais diversas. A plataforma utilizada foi a CytoScan™ 750k (Affymetrix, EUA) e a análise foi realizada por meio do software Chromosome Analysis Suite (ChAS), do mesmo fabricante. **Resultados:** Dos 21 pacientes investigados, oito apresentaram alterações identificadas na CMA. Dentre os oito, cinco possuíam uma alteração classificada como patogênica ou potencialmente patogênica, capazes de explicar o fenótipo do paciente. Os demais pacientes (n=3) possuíam alterações interpretadas como variantes de significado incerto (VOUS). Neste estudo, a taxa diagnóstica da CMA foi de 23,8%. **Conclusão:** A CMA é uma técnica com alta taxa diagnóstica para pacientes que apresentam malformações cerebrais e pode ser utilizada como técnica inicial para a investigação genética neste grupo.

Palavras-chave: malformação cerebral; deficiência intelectual; deleção; duplicação; CNV; CMA; microarray.

ABSTRACT

Introduction: Brain malformations are morphological defects of the brain caused by an intrinsically abnormal process. The symptoms presented by the patients are varied, depending on the type of malformation and its severity. The development of the central nervous system (CNS) is complex, involving several genes that interact with each other and that can sometimes be modulated by environmental factors. Among the possible causes of brain malformations are genetic alterations. Chromosome microarray analysis (CMA) is a technique able to detect mainly deletions and duplications with a suggested high diagnostic rate. Studies evaluating the genetic contribution to CNS formation are important for a better understanding of neurodevelopment as a whole. **Objective:** The objective of the present project is to identify genomic regions associated with heterogeneous brain malformations by analyzing submicroscopic chromosomal changes through CMA and establishing a genotype-phenotype relationship. **Methods:** The CMA technique was performed in 21 patients with diverse brain malformations. The platform used was CytoScan™ 750k (*Affymetrix*, USA) and the analysis was performed using the Chromosome Analysis Suite (ChAS) software, from the same manufacturer. **Results:** Of the 21 patients investigated, eight presented alterations identified in the CMA. Among the eight patients, five had an alteration classified as pathogenic or potentially pathogenic, capable of explaining the patient's phenotype. The remaining patients (n=3) had alterations interpreted as variants of uncertain significance (VOUS). In this study, the diagnostic rate of the CMA was 23,8%. **Conclusion:** CMA is a technique with a high diagnostic rate for patients with cerebral malformations and can be used as the initial technique for genetic research in this group.

Keywords: brain malformation; intellectual disability; deletion; duplication; CNV; CMA; microarray.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Quatro estágios da neurulação. Modificado de (7)..... 16
- Figura 2. Diagrama de uma secção transversal da medula espinhal em desenvolvimento. Diferentes subtipos de progenitores neurais se distribuem em uma ordem específica no eixo dorsoventral. Esse padrão é estabelecido pela ação de gradientes de morfógenos: SHH, secretado pela notocorda (N) e pela placa do assoalho (PA), Wnts e BMPs, produzidos pela placa do teto (PT) e ácido retinoico (AR), pelos somitos adjacentes. Modificado de (12). 18
- Figura 3. Diferentes estágios do desenvolvimento do SNC: A) SNC com vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. B) SNC com vesículas encefálicas secundárias: a vesícula do prosencéfalo se divide em telencéfalo e diencefalo; o rombencéfalo se divide em metencéfalo e mielencéfalo, e o mesencéfalo permanece como uma única vesícula. C) Flexuras cefálica e cervical se formam. D) Em seguida, há a formação da flexura pontina. As flexuras contribuem para o formato anatômico final do SNC. Modificado de (13). 19
- Figura 4. Defeitos do fechamento do tubo neural: A) Anencefalia, B) encefalocele occipital, C) mielomeningocele lombar com hidrocefalia associada e D) craniorraquisquise. Modificado de (3).....23
- Figura 5. Espectro da holoprosencefalia, abrangendo a holoprosencefalia alobar, em que não ocorre a separação dos hemisférios cerebrais; a semilobar, em que há a separação de forma incompleta, e a lobar, em que há a separação quase completa dos hemisférios cerebrais, mas ainda há fusão de estruturas internas. Modificado de (32). 25
- Figura 6. Vias envolvidas na geração, ação e degradação do AR. O retinol se liga à proteína RBP4 no plasma e entra na célula através do receptor STRA6. Dentro da célula, o retinol é metabolizado em AR. Ele pode ser transportado para o núcleo, onde se liga aos receptores RXR e RAR, que por sua vez se ligam a uma sequência específica no DNA, denominada RARE. Modificado de (46)..... 30
- Figura 7. Perfil de expressão de Wnts durante o desenvolvimento cerebral em mamíferos. Modificado de (58)..... 35

Figura 8. Modelo da regulação Wnt/BMP na medula espinhal. A via Wnt induz a proliferação e inibe a diferenciação. A via BMP induz a diferenciação e inibe a proliferação. Ambas as vias são capazes de regular a expressão uma da outra, ilustrado pelas setas curvadas. Modificado de (59).36

Figura 9. Esquema representando a posição de genes HOX no cromossomo em *Drosophila*, humanos e camundongos. Os genes em amarelo são expressos na região anterior e estão localizados mais terminalmente no cromossomo, enquanto genes expressos nas regiões mais caudais estão localizados em sequência. Modificado de (64).38

Figura 10. Esquema representando o processo de inibição lateral. A) O neurônio em desenvolvimento expressa uma proteína ligada à membrana, como por exemplo a Delta, que se liga a receptores Notch nas células vizinhas e inibe a diferenciação destas células em neurônios. Assim, a célula que expressa a Delta vai se diferenciar em neurônio enquanto as células adjacentes vão se manter como células epiteliais. B) De início, todas as células expressam Notch e Delta. Algumas células apresentam uma tendência a se especializar e, conseqüentemente, expressam um sinal inibitório maior, fazendo com que as células vizinhas não se diferenciem. Modificada de (76).41

Figura 11. Esquema representado o GeneChip® com suas sondas. O DNA extraído se liga aos fragmentos de DNA de sequência conhecida e são detectados através de fluorescência. Modificado de (119).53

Figura 12. Resultado de exame de CMA da paciente HUB1 (A) e de sua mãe (B), visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 6 (barras vermelhas na parte superior) que possui aproximadamente 325 kbps.62

Figura 13. Resultado de exame de CMA do paciente HUB2, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 9 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 120 kbps.68

Figura 14. Resultado de exame de CMA da paciente SC1, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada

do cromossomo 9 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 98 kbps.72

Figura 15. Resultado de exame de CMA do paciente SC2, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região duplicada do cromossomo 11 (barra azul na parte superior) que possui aproximadamente 229 kbps.75

Figura 16. Resultado de exame de CMA da paciente SC3, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 1 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 2,7 Mb.80

Figura 17. Resultado de exame de CMA do paciente HUB3, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 22 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 653 kbps.84

Figura 18. Resultado de exame de CMA da paciente SC4, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 2 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 1,5 Mb.88

Figura 19. Resultado de exame de CMA da paciente SC5, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região duplicada do cromossomo 12 (barras azuis na parte superior) que possui aproximadamente 470 kbps, com uma pequena região deletada entre elas (barra vermelha).....91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais malformações cerebrais de acordo com as quatro classificações e CNVs associadas ao fenótipo.....	46
Quadro 2 - Estratégias para interpretação de CNVs. Modificado de (105).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das MCs encontrada nos pacientes, tipo de CNVs, coordenadas genômicas e classificação encontradas nos pacientes59

Tabela 2 - Descrição das malformações cerebrais encontradas nos pacientes, CNVs identificadas, com tamanho, classificação e genes candidatos92

LISTA DE ABREVIATURAS

- aCGH Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarray
- AMPK proteína quinase ativada por AMP
- AR ácido retinoico
- BAC cromossomos artificiais de bactérias
- BMP do inglês, bone morphogenetic protein
- CDC do inglês, Centers for Disease Control and Prevention
- CEP-FM/UnB Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília
- CEP/UFG Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás
- ChAS Chromosome Analysis Suite
- CMA análise cromossômica por microarray
- CNV variações no número de cópias
- DECIPHER do inglês, Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
- DI deficiência intelectual
- DGV do inglês, Database of Genomic Variants
- DNA ácido desoxirribonucléico
- DRGE doença do refluxo gastroesofágico
- DVP derivação ventrículo-peritoneal
- EDTA ácido etileno diamina tetracético
- FISH hibridização fluorescente in situ
- FGF do inglês, Fibroblast Growth Factor
- FOX forkhead-box
- HOX homeo box
- HUB Hospital Universitário de Brasília
- ISCN do inglês, International System for Human Cytogenetic Nomenclature
- ITU infecção do trato urinário

Kb quilo base (milhares de bases)
LCR do inglês, Low Copy Repeats
MC malformações cerebrais
Mb mega bases (milhões de bases)
MLPA Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
OMIM do inglês, Online Mendelian Inheritance in Man
OMS Organização Mundial de Saúde
pb pares de base
PCR reação em cadeia da polimerase
PNH heterotopia periventricular nodular
RAR receptor de ácido retinoico
RARE elementos de resposta ao ácido retinoico
RM ressonância magnética
RXR receptor de retinoide X
RXRE elementos de resposta ao retinoide X
SHH Sonic Hedgehog
SNC sistema nervoso central
SNP do inglês, Single Nucleotide Polymorphism
TC tomografia computadorizada
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA Transtorno do espectro autista
TCG tônico-clônico generalizada
UTI Unidade de Terapia Intensiva
VOUS do inglês, Variants of Unknown Significance
VSJBC Vila São José Bento Cottolengo
Wnt do inglês, Wingless/Integrated

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	15
1.2	As Malformações Cerebrais	21
1.3	Vias biológicas e genes associados ao desenvolvimento do SNC e às malformações cerebrais	28
1.3.1	Impacto da via do ácido retinoico (AR) no desenvolvimento do SNC..	29
1.3.2	Impacto da via do <i>Sonic Hedgehog</i> (SHH) no desenvolvimento do SNC	31
1.3.3	Impacto da via do <i>BMP</i> no desenvolvimento do SNC	32
1.3.4	Impacto da via <i>Wnt</i> no desenvolvimento do SNC	33
1.3.5	Impacto da via do <i>FGF</i> no desenvolvimento do SNC.....	36
1.3.6	Genes <i>HOX</i> , <i>FOX</i> e <i>SOX</i>	37
1.3.7	Impacto da via do <i>Notch/Delta</i> no desenvolvimento do SNC	40
1.4	Fatores ambientais associados à ocorrência de malformações cerebrais	42
1.4	Variações no número de cópias (CNV) e sua investigação por meio de Análise cromossômica por microarray	43
1.5	Justificativa	46
2.	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Grupo amostral e Considerações Éticas	49
3.2	Critérios de Inclusão.....	50
3.3	Critérios de Exclusão.....	50

3.4	Técnicas laboratoriais.....	51
3.4.1	Cariótipo	51
3.4.2	EXTRAÇÃO DE DNA PARA EXAMES MOLECULARES.....	52
3.4.3	Exame do X-Frágil	52
3.4.4	Análise Cromossômica por Microarray	53
3.4.5	Classificação e Interpretação das CNVs.....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSAO	58
4.1	Taxa de diagnóstico	58
4.2	Pacientes com alterações patogênicas	61
4.2.1	Paciente HUB1	61
4.2.2	Paciente HUB2	67
4.2.3	Paciente SC1.....	71
4.2.4	Paciente SC2.....	74
4.2.5	Paciente SC3.....	79
4.3	Pacientes com alterações consideradas VOUS.....	83
4.3.1	Paciente HUB3	83
4.3.2	Paciente SC4.....	87
4.3.3	Paciente SC5.....	90
5.	CONCLUSÃO	92

1. INTRODUÇÃO

Defeitos congênitos relacionados à malformação do sistema nervoso central (SNC) têm sido motivo de investigações científicas desde períodos remotos da história humana. Atualmente, apesar do avanço do conhecimento nas áreas de ciências médicas e biológicas, a etiologia de anomalias congênitas da medula e encéfalo, ou anomalias congênitas do SNC, ainda é pouco compreendida (1).

A formação do sistema nervoso se inicia na 3ª semana do desenvolvimento, após a gastrulação, e continua a se desenvolver mesmo após o nascimento, com a maturação da mielinização aos três anos de idade (2). Fatores intrínsecos e extrínsecos são capazes de perturbar a formação normal do SNC, causando malformações. Entre os fatores intrínsecos conhecidos estão as alterações genéticas submicroscópicas (3).

A análise cromossômica por microarray (CMA) é capaz de detectar alterações submicroscópicas, com alta taxa diagnóstica. A identificação de genes e regiões genômicas associados à formação do SNC contribui para o melhor entendimento do neurodesenvolvimento como um todo.

1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC é constituído pelo cérebro e pela medula espinhal, sua formação se inicia a partir da 3ª semana do desenvolvimento (4,5), no processo de neurulação, composto de quatro estágios: formação da placa neural, modelamento da placa neural, dobramento da placa neural e fechamento do sulco neural (6).

Durante a neurulação, a notocorda libera a proteína Sonic Hedgehog (SHH) e induz células do ectoderme dorsal adjacente a expressarem um conjunto de genes específicos, que levam tais células a se diferenciarem das demais. Essa indução envolve

sinais que inibem a transformação da ectoderme de superfície em epiderme. Essas células, chamadas de células da neuroectoderme, então se alongam e formam a placa neural (6) (Figura 1,A).

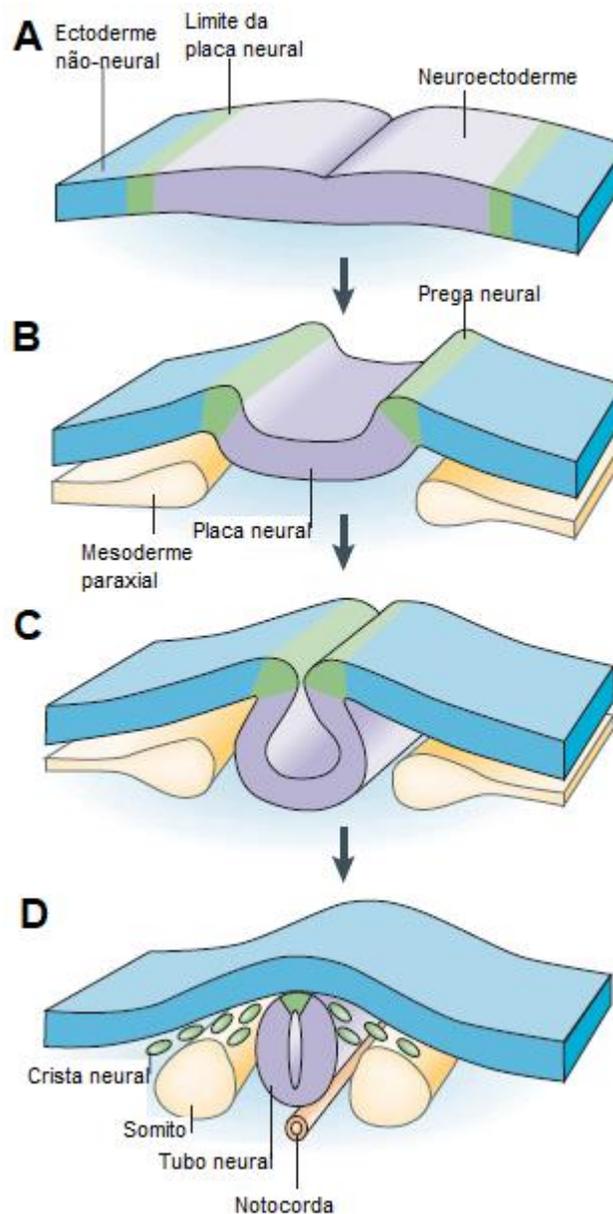


Figura 1. Quatro estágios da neurulação. Modificado de (7).

Após a formação da notocorda, esta exerce um efeito indutivo nas células da placa neural, alterando o formato das células e a expressão de moléculas de adesão, tanto nas pregas neurais, como no sulco neural (6) (Figura 1, B). Posteriormente, a placa neural se

alonga no sentido rostral e as bordas laterais situadas na junção da ectoderme de superfície não-neural (pregas neurais) se levantam dorsalmente para formar o sulco neural (6).

As pregas neurais se aproximam e se soldam, formando um tubo longo, que será internalizado dorsalmente, e recoberto pela ectoderme de superfície (Figura 1, C e D). Este tubo, o tubo neural, será o primórdio do SNC. Assim, a partir de uma estrutura plana, ocorre a formação de um tubo interno composto por células originadas da ectoderme e coberto pela epiderme dorsal. O tubo neural começa seu fechamento na região do quarto somito e nas direções caudal e cranial, formando o neuroporo anterior e posterior (4). O neuroporo anterior é fechado inicialmente, por volta do 24^o dia após a fertilização, sendo seguido pelo neuroporo posterior, que se fecha em torno do 28^o dia (8).

Um conjunto de células específicas da porção dorsal do tubo neural delaminam e migram para regiões diferentes no embrião (Figura 1, D, em verde). Essas células, denominadas células da crista neural (6,9), são capazes de se diferenciar em outros tecidos, como por exemplo em tecido cartilaginoso, ósseo e conjuntivo, e têm atraído atenção por essa capacidade de criar diferentes linhagens celulares, além de sua capacidade de migração.

Com o tubo neural formado, as células que o compõem se diferenciam de acordo com o gradiente de morfógenos liberados pelas estruturas adjacentes. Morfógenos são moléculas que direcionam a diferenciação celular de acordo com sua concentração. Os dois principais morfógenos liberados são a proteína SHH, expressa pelas células da notocorda, que promove a ventralização do embrião; e a proteína óssea morfogenética BMP (do inglês, *bone morphogenetic protein*), pela ectoderme, que promove a dorsalização (6) (Figura 2). A liberação desses dois morfógenos ativa a expressão de diferentes genes, entre eles, os genes *Hox* (***H*omeo *B*ox**), responsáveis entre outras funções, pela padronização do corpo do embrião (10,11).

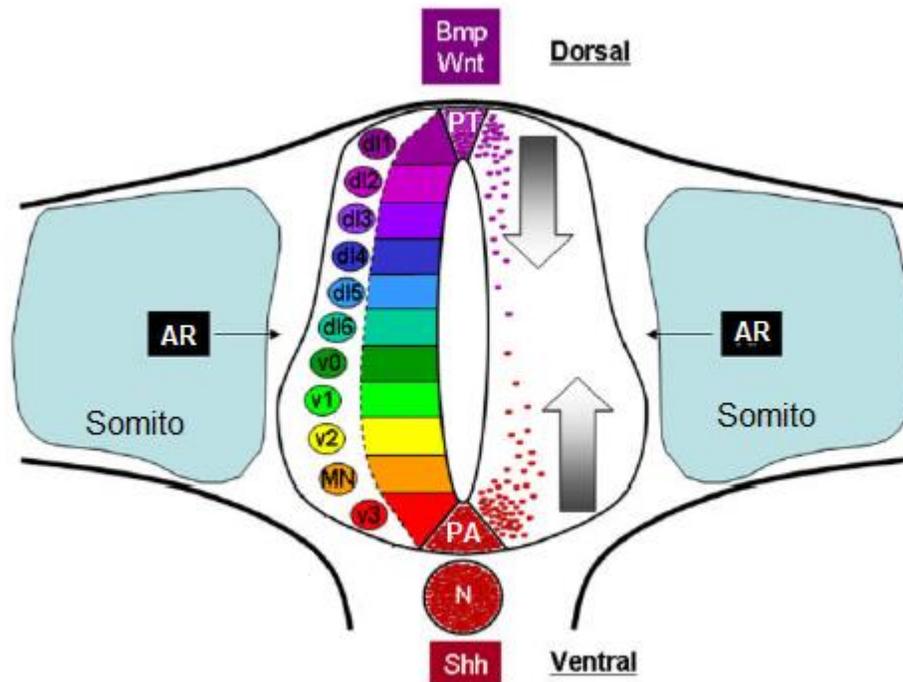


Figura 2. Diagrama de uma secção transversal da medula espinhal em desenvolvimento. Diferentes subtipos de progenitores neurais se distribuem em uma ordem específica no eixo dorsoventral. Esse padrão é estabelecido pela ação de gradientes de morfógenos: SHH, secretado pela notocorda (N) e pela placa do assoalho (PA), Wnts e BMPs, produzidos pela placa do teto (PT) e ácido retinoico (AR), pelos somitos adjacentes. Modificado de (12).

A diferença de concentração de morfógenos leva não somente a uma diferenciação celular, mas também a uma multiplicação celular distinta ao longo do tubo. A consequência desta divisão celular não uniforme é o espessamento de regiões específicas que formarão as diferentes vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo (mais anterior), o mesencéfalo (em posição intermediária) e o rombencéfalo (mais posterior) (5) (Figura 3, A). Na sequência, a vesícula do prosencéfalo se divide em duas novas vesículas, o telencéfalo e o diencéfalo, assim como o rombencéfalo dará origem ao metencéfalo e o mielencéfalo. O mesencéfalo permanece como uma única vesícula (Figura 3, B).

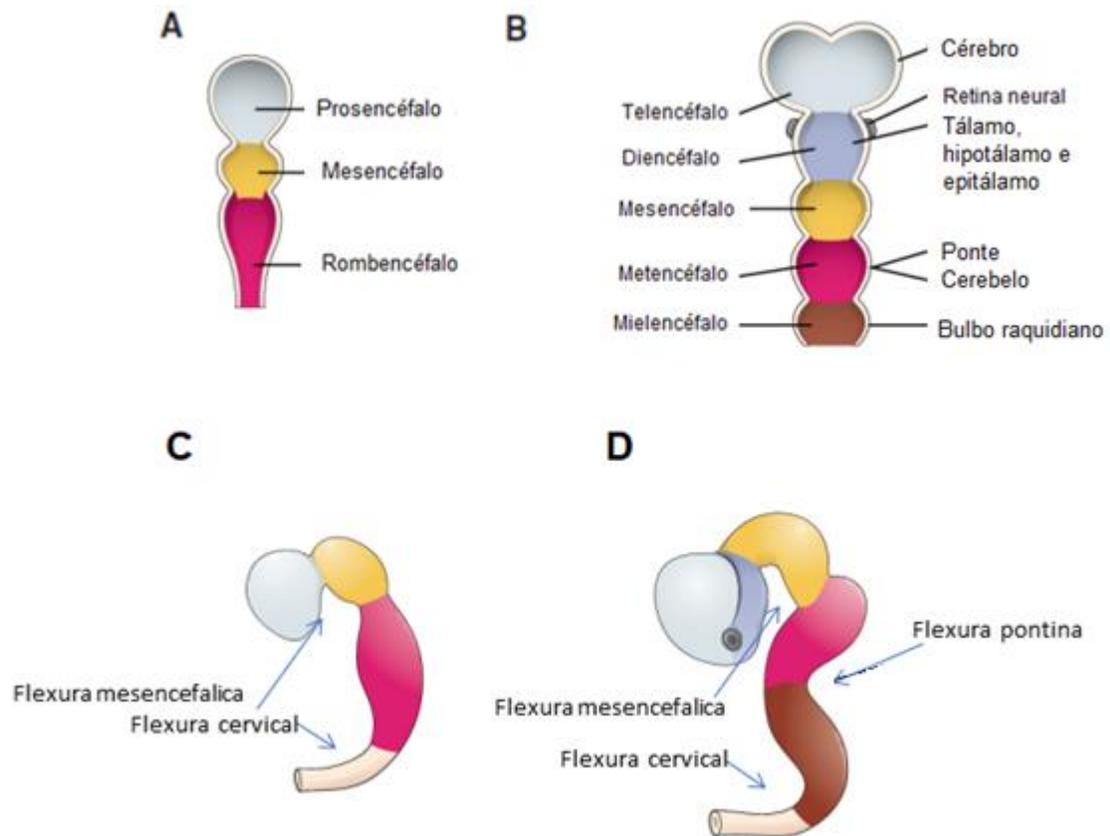


Figura 3. Diferentes estágios do desenvolvimento do SNC: A) SNC com vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. B) SNC com vesículas encefálicas secundárias: a vesícula do prosencéfalo se divide em telencéfalo e diencéfalo; o rombencéfalo se divide em metencéfalo e mielencéfalo, e o mesencéfalo permanece como uma única vesícula. C) Flexuras céfalica e cervical se formam. D) Em seguida, há a formação da flexura pontina. As flexuras contribuem para o formato anatômico final do SNC. Modificado de (13).

À medida em que as vesículas crescem, o encéfalo perde sua forma longilínea e se curva ventralmente graças às flexuras (Figura 3, C). As flexuras mesencefálicas e cervicais, respectivamente no mesencéfalo e entre o rombencéfalo e a medula, permitem a forma arqueada ventral, enquanto a flexura pontina (em direção oposta), entre o mielencéfalo e o metencéfalo, permitirá a diferenciação da ponte e do cerebelo. Assim, o cérebro adquire seu formato anatômico que se assemelha ao da forma adulta, com o telencéfalo envolvendo o diencéfalo, ambos na parte cranial, acima do mesencéfalo, e com o metencéfalo e o mielencéfalo na região caudal (Figura 3, D) (14).

Por volta de 4 semanas do desenvolvimento, o telencéfalo dará origem aos dois hemisférios cerebrais; mais especificamente, os córtices cerebrais e estruturas subcorticais, como hipocampo e bulbo olfatório. O diencéfalo originará a estruturas

internas, como tálamo, hipotálamo e hipófise (5). Além disso, a evaginação lateral do diencéfalo dará origem às estruturas oculares, por meio da formação das vesículas ópticas e, posteriormente, dos cálices ópticos (15). O mesencéfalo dará origem ao teto, tegmento, aqueduto cerebral e a parte do cerebelo (16). O metencéfalo originará o cerebelo e a ponte; já o mielencéfalo originará o bulbo raquidiano. As estruturas do mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo compõem o que se conhece como tronco encefálico (17).

O córtex cerebral, formado a partir do telencéfalo, é uma estrutura complexa e responsável por vários processos cerebrais importantes, como memória, linguagem, cognição e percepção dos sentidos. Possui seis camadas celulares, da mais externa para a mais interna: molecular, granular externa, piramidal externa, granular interna, piramidal interna e polimórfica, ou multiforme (18,19). A estrutura laminar cortical é definida na 8ª semana de gestação e é nesse período também que se formam as primeiras sinapses (5).

A migração coordenada de células durante o processo de desenvolvimento cortical é essencial para que se posicionem nas regiões corretas (20). Assim, no SNC, a substância branca está localizada na parte interna do cérebro, enquanto a cinzenta está principalmente localizada na parte cortical (5). Por esse motivo, defeitos de migração celular podem ser identificados através da observação de substância branca ou cinzenta fora de seu local típico.

Por último, um componente importante para o cérebro é o líquido cefalorraquidiano, produzido pelo plexo coroide, nos ventrículos cerebrais (21). O sistema ventricular é composto pelos dois ventrículos laterais, o terceiro e o quarto ventrículo. O líquido cefalorraquidiano é importante para a homeostase, proteção e eliminação de produtos metabólicos do cérebro (22). Alterações no fluxo do líquido cefalorraquidiano pelo sistema ventricular podem causar hidrocefalia e aumento de pressão intracranial.

O SNC é protegido por três meninges. A mais próxima é a pia-máter, uma membrana fina e delicada firmemente aderida ao cérebro e à medula espinhal. A segunda meninge é a aracnoide, cujo nome deriva da sua aparência similar a uma teia de aranha. Entre a pia-máter e a aracnoide existe um espaço preenchido pelo líquido cefalorraquidiano, fornecendo amortecimento contra choques mecânicos. Por último,

próxima ao crânio, há a dura-máter. A dura-máter é uma membrana grossa e dura e consiste em duas camadas, uma afixada aos ossos do crânio, e outra camada interna que fica mais próxima ao cérebro. As meninges são atravessadas por vasos sanguíneos, responsáveis por nutrir o cérebro e protegê-lo contra patógenos, através da barreira hematoencefálica (23).

1.2 AS MALFORMAÇÕES CEREBRAIS

Malformação é um defeito morfológico de um órgão ou parte dele, causado por um processo intrinsecamente anormal, como por exemplo as alterações genéticas, que estão presentes desde a fecundação (24).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define malformações congênitas como anomalias estruturais ou funcionais (que incluem distúrbios metabólicos) que ocorrem durante a vida intrauterina e, portanto, que estão presentes ao nascimento. Entre as possíveis causas estão: defeitos de um único gene, alterações cromossômicas, herança multifatorial, exposição a teratógenos e deficiências nutricionais (3).

O cérebro é constituído pelas estruturas formadas a partir das cinco vesículas primárias: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo. Assim, as malformações cerebrais (MC) são defeitos morfológicos envolvendo tais estruturas, como por exemplo, hemisférios cerebrais, tálamo, hipotálamo, ponte e bulbo raquidiano (25). A formação do SNC é um processo complexo em que vários fatores, tais como moléculas sinalizadoras, precisam atuar de maneira organizada. Logo, qualquer evento que venha a interferir neste processo pode resultar em defeitos no SNC. A incidência das MCs é estimada como sendo presente em 1% dos indivíduos nascidos vivos (2).

As MCs são altamente heterogêneas e podem apresentar quadros clínicos em vários graus: de pacientes assintomáticos com agenesia completa de corpo caloso a casos de holoprosencefalia alobar incompatíveis com a vida (26,27). Os sintomas e o

prognóstico das malformações cerebrais variam de acordo com a gravidade da malformação.

Existem cerca de 2000 tipos de MCs descritas, com incidência em torno de um por cento dos nascidos vivos. As MCs brevemente descritas a seguir serão classificadas em quatro grupos, respeitando os estágios de formação temporal do SNC, dos estágios mais iniciais para os mais tardios: defeitos de fechamento do tubo neural, defeitos de separação prosencefálica, defeitos de organogênese e defeitos de migração neuronal (2).

1.2.1 Defeitos De Fechamento Do Tubo Neural

Os defeitos de fechamento do tubo neural ocorrem entre a 3^a e a 5^a semana do desenvolvimento, envolvem o cérebro e a medula espinhal e são um dos tipos de MCs mais comuns (2,3). Falhas no fechamento do neuroporo anterior causam condições como anencefalia e encefaloceles (Figura 4, A e B). A anencefalia é a ausência total ou parcial do cérebro, além da ausência do crânio (3). As encefaloceles são herniações de tecido nervoso, geralmente coberto pelas meninges, e podem se apresentar em várias regiões, tendo sua classificação de acordo com o local: encefalocele frontal, parietal, occipital, orbital ou nasal (2,3). A severidade do quadro de encefalocele depende da quantidade de tecido herniado, que é considerado não-funcional (2).

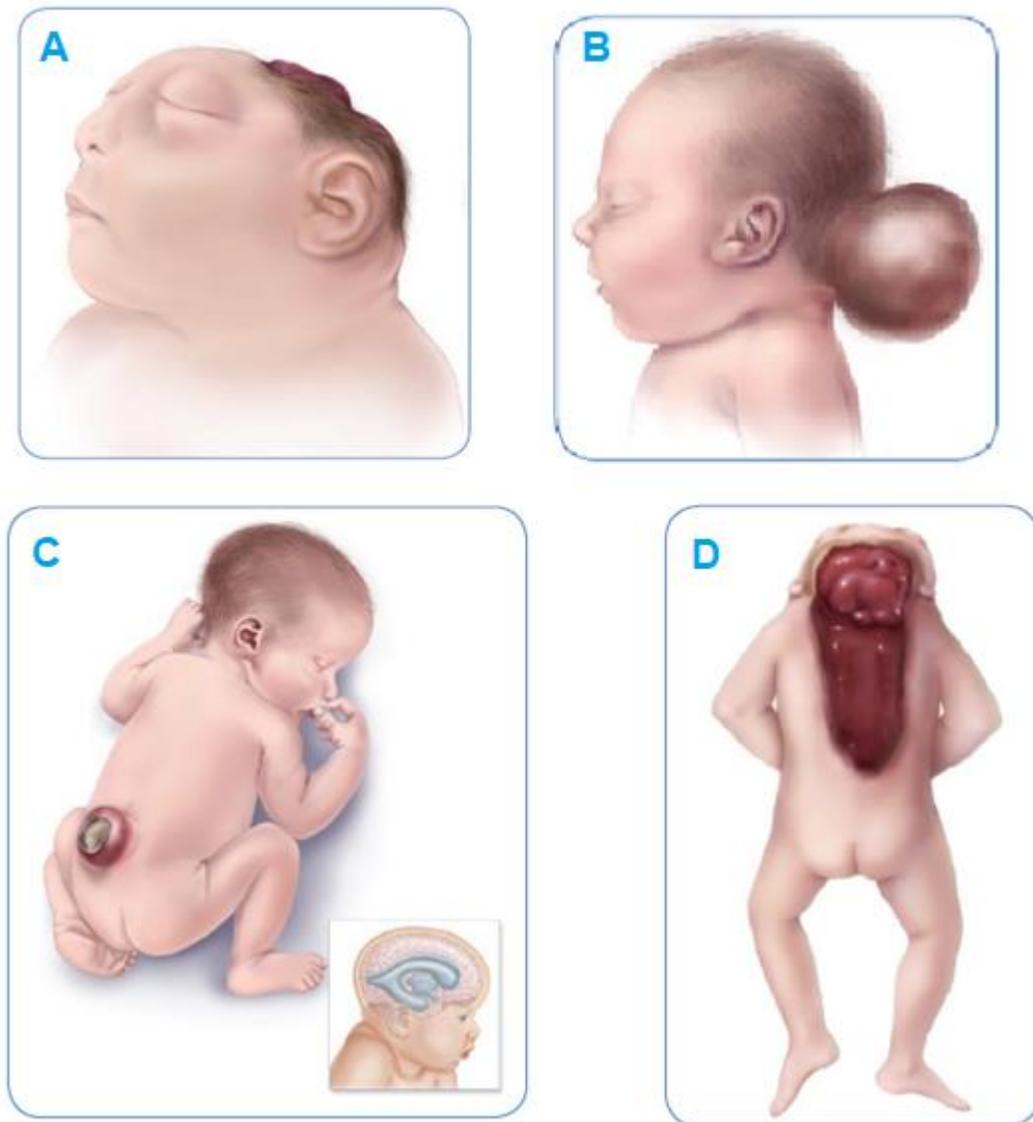


Figura 4. Defeitos do fechamento do tubo neural: A) Anencefalia, B) encefalocele occipital, C) mielomeningocele lombar com hidrocefalia associada e D) craniorraquisquise. Modificado de (3).

Defeitos no fechamento do neuroporo posterior causam espinha bífida. A espinha bífida é uma herniação de conteúdo variado, coberta pela epiderme ou por meninge, e que pode se apresentar nas regiões cervical, torácica, lombar ou sacral (Figura 4, C). Um dos sinais comuns associados à espinha bífida é a hidrocefalia, em razão da alteração no fluxo normal do líquido cefalorraquidiano (3). Na mielomeningocele, parte da medula espinhal e nervos projetam-se além das costas do indivíduo e podem causar perda de sensação ou paralisia nos membros inferiores (28). Na meningocele, observa-se um saco

com fluido, mas sem conteúdo nervoso projetado além das costas do indivíduo. Na espinha bífida oculta, há uma pequena abertura na medula espinhal, mas não se observa herniação. É possível que haja alguma alteração leve na região afetada, como um *dimple* sacral ou hipertricrose, mas geralmente essa condição não causa sintomas notáveis (28).

Quando há um defeito no fechamento de ambos os neuroporos, ocorre uma condição denominada craniorraquisquise (Figura 4, D). O fenótipo apresenta-se como anencefalia ligada a um defeito de fechamento da medula espinhal e ausência das meninges protegendo o tecido nervoso (3).

Suplementação com ácido fólico diminui a incidência de defeitos do fechamento do tubo neural (29,30), porém, cerca de 30% dos casos não responde à suplementação (31). Entre as causas dos defeitos de fechamento que não respondem à suplementação encontram-se alterações genéticas, como herança de um cromossomo inteiro e alterações submicroscópicas. Além disso, uma mutação no gene *MHTFR*, envolvido no metabolismo do ácido fólico, foi associado a esse tipo de malformação (31).

1.2.2 Defeitos De Separação Prosencefálica

A formação das vesículas cerebrais ocorre entre a 4^a e a 10^a semana de gestação (2,5). O prosencéfalo se divide em telencéfalo e diencéfalo e, posteriormente, o telencéfalo dará origem aos hemisférios cerebrais. Defeitos de separação do prosencéfalo em dois hemisférios distintos causam uma condição conhecida como holoprosencefalia, que é observada em um espectro do caso mais severo, a holoprosencefalia alobar, para o mais brando, a displasia septo-óptica (Figura 5). Nos casos de holoprosencefalia, a medula espinhal e o cerebelo geralmente apresentam morfologia normal (2).

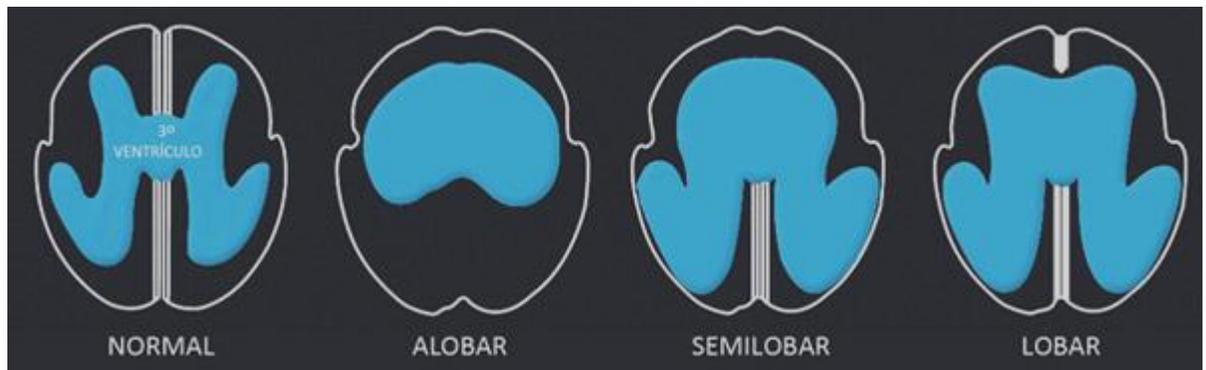


Figura 5. Espectro da holoprosencefalia, abrangendo a holoprosencefalia alobar, em que não ocorre a separação dos hemisférios cerebrais; a semilobar, em que há a separação de forma incompleta, e a lobar, em que há a separação quase completa dos hemisférios cerebrais, mas ainda há fusão de estruturas internas. Modificado de (32).

Na holoprosencefalia alobar, não há separação dos hemisférios e várias estruturas mediais estão ausentes ou fundidas. Na holoprosencefalia semilobar, há uma separação parcial dos hemisférios, mas ainda há fusão ou ausência de estruturas mediais, como o septo pelúcido, o corpo caloso, o tálamo e os núcleos da base. Na holoprosencefalia lobar, há a separação quase completa dos hemisférios, sendo possível distingui-los. Ainda há ausência de septo pelúcido, mas é possível observar separação total de estruturas como tálamo e os núcleos da base. Por fim, há a displasia septo-óptica, que pode ser considerada uma forma mais leve da holoprosencefalia lobar, em que os hemisférios estão separados, mas há alterações de estruturas mediais, como ausência de septo pelúcido e hipoplasia do nervo óptico e do quiasma óptico. Durante essa fase do desenvolvimento também há a formação da face, onde a formação de várias estruturas são dependentes de estímulos do neuroectoderma do prosencéfalo. A ausência de separação do prosencéfalo pode então levar ao comprometimento da formação de estruturas específicas, em especial da linha média, gerando, por exemplo, ciclopia, arrinencefalia e cebocefalia (2).

Genes que participam de vias de morfógenos como as vias de sinalização do *SHH*, *BMP* e *NOTCH* já foram associados a quadros de holoprosencefalia (33,34). Como as MCs observadas encontram-se em um espectro, existem quadros mais graves, com componente genético mais forte, e quadros mais leves, com herança multifatorial, em que o componente genético está presente, mas com participação de vários genes.

1.2.3 Defeitos De Organogênese

Os defeitos de organogênese ocorrem mais tardiamente que os defeitos de fechamento de tubo neural e de separação prosencefálica, afetando a forma ou tamanho de estruturas cerebrais. O corpo caloso é uma estrutura que conecta os hemisférios direito e esquerdo. É dividido em rostro, genu, corpo e esplênio. Na agenesia total de corpo caloso, essa estrutura está totalmente ausente e é possível que outras estruturas próximas também sejam afetadas, como o giro cingulado. Na agenesia parcial, o esplênio e o rostro estão ausentes ou hipoplásicos (2).

A malformação de Chiari consiste em uma alteração cerebelar e é dividida em quatro tipos. No tipo I, o mais comum, há a herniação do cerebelo através do forame magno e hidrocefalia compensada. No tipo II, há acometimento do crânio, da dura-máter e da medula espinhal, além do. Os hemisférios cerebelares engolfam o tronco encefálico e podem herniar através da incisura tentorial, causando deformações no tecto. Frequentemente, apresenta-se com mielomeningocele. O tipo III consiste em características da malformação de Chiari tipo II e encefalocele occipital ou cervical. A encefalocele pode conter meninges, tecido do cerebelo, do lobo occipital ou do tronco encefálico. No quarto tipo, o cerebelo apresenta hipoplasia ou displasia severas, tronco encefálico pequeno, mas sem hidrocefalia ou outras anomalias do SNC (2).

A malformação de Dandy-Walker consiste na dilatação do quarto ventrículo, agenesia parcial ou completa do verme cerebelar e hipoplasia dos hemisférios cerebelares. Há um aumento da fossa posterior, compressão do tronco encefálico e, possivelmente, hidrocefalia associada. A variante de Dandy-Walker é um quadro mais leve, em que há hipoplasia do verme inferior e comunicação com o quarto ventrículo, mas sem acometimento do tronco encefálico e da fossa posterior, e hidrocefalia é incomum (2).

Genes associados a malformações cerebelares incluem *FOXC1*, *CHD7* e *POMT1*, associados, respectivamente, à malformação de Dandy-Walker, à síndrome CHARGE, à síndrome Walker–Warburg e à hiperplasia pontocerebelar (35). Ademais, há

várias mutações em um único gene que foram associadas a síndromes que apresentam malformações do corpo caloso. Como exemplo, os genes *CREBBP*, *HESX1* e *FGFR2*, associados, respectivamente, à síndrome Rubinstein-Taybi à displasia septo-óptica e à síndrome de Apert (36).

1.2.4 Defeitos De Migração Neuronal

A migração neuronal ocorre principalmente entre dois e cinco meses de gestação (2). Defeitos de migração neuronal afetam, particularmente, o desenvolvimento cortical e os sinais geralmente envolvem deficiência motora ou cognitiva e epilepsia (37–39). Entre os principais defeitos de migração neuronal encontram-se polimicrogiria, lisencefalia, heterotopia, esquizencefalia e hemimegalencefalia (2). A polimicrogiria caracteriza-se por um padrão de giros pequenos e irregulares (2,37,39,40). Em contraste, a lisencefalia refere-se a uma condição em que os giros e sulcos não se formam apropriadamente, dando ao cérebro uma aparência lisa (2,39). A ausência completa de giros denomina-se agiria, enquanto a ausência parcial denomina-se paquigiria. A lisencefalia pode ser dividida em três tipos. No tipo I, há um espessamento do córtex cerebral, colpocefalia e giros largos. É considerada a forma clássica da lisencefalia e é associada à síndrome de Miller-Dieker. No tipo II, há também o espessamento cortical, mas a superfície tem uma aparência. O tipo II é associado a condições que apresentam distrofia muscular, como a distrofia muscular de Fukuyama e a síndrome de Walker-Warburg (2,37). O tipo III apresenta-se como microcefalia, espessamento cortical moderado e hipoplasia do cerebelo e do tronco encefálico (2).

Heterotopias são caracterizadas pela presença de neurônios normais em locais anormais e podem ser encontradas em nódulos ou bandas (2,37,39). As regiões mais comuns são em torno dos ventrículos e abaixo do córtex (2,37). Outras MCs são comuns em casos de heterotopia, como malformações calosais, disgenesia cerebelar e, além

disso, o córtex adjacente à heterotopia comumente apresenta paquigira ou polimicrogira (2,37,39).

A esquizecefalia caracteriza-se pela presença de substância cinzenta heterotópica que se estende da região ventricular à superfície do cérebro, atravessando a substância branca. Há dois tipos de esquizecefalia: a de lábio aberto e a de lábio fechado. No caso da esquizecefalia de lábio aberto, há uma fenda preenchida por líquido cefalorraquidiano e cujas paredes não se tocam. Já na esquizecefalia de lábio fechado, as paredes da fenda se tocam e não há influxo de líquido cefalorraquidiano (2,39). Frequentemente ocorre em conjunto com polimicrogira (39).

Por fim, a hemimegalencefalia é o crescimento de parte ou de todo o hemisfério cerebral. O ventrículo ipsilateral pode apresentar dilatação, além de anomalias de migração no córtex, como polimicrogira ou paquigira, e desmielinização da substância branca (2). A megalencefalia caracteriza-se pelo crescimento anormal do cérebro como um todo. A estrutura anatômica do cérebro pode ser normal, apesar do aumento do tamanho e espessamento das estruturas cerebrais, mas também pode apresentar outras anomalias, como polimicrogira e heterotopias. O quadro clínico da hemimegalencefalia e da megalencefalia é bastante variável, com os sinais mais comuns incluindo atraso do desenvolvimento, DI e epilepsia (39).

1.3 VIAS BIOLÓGICAS E GENES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO SNC E ÀS MALFORMAÇÕES CEREBRAIS

Condizente com a heterogeneidade clínica, uma grande quantidade de genes foi identificada como causadora de diversas MCs. Genes que atuam na proliferação e migração celular, organização cortical, conexão entre células e apoptose foram indicados como responsáveis por processos importantes durante a formação do SNC (41).

O SNC é um sistema complexo e vários mecanismos genéticos precisam funcionar de forma organizada para sua devida formação. Vias de sinalização como as do ácido

retinoico (AR) (42), *SHH*, *BMP*, *Wingless/Integrated* (Wnt) e *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (6,9,43) e outras famílias de genes contribuem para o desenvolvimento do SNC. As vias do AR, *SHH*, *BMP*, *Wnt* e *FGF* são importantes para a neurogênese pois atuam no início da diferenciação celular, regulando vias completas. Outros genes que regulam o início de cascatas de reações são importantes para o desenvolvimento do SNC. Um exemplo de tais genes são os codificadores de fatores de transcrição, como os genes da família *Hox*, *Fox* e *Sox* (43).

Há uma grande quantidade de vias responsáveis pela formação do SNC e essas vias abrangem centenas de genes. Apenas as vias do AR, *SHH*, *BMP*, *Wnt*, *FGF*, de genes com homeodomínios (*Hox*, *Fox* e *Sox*) e Notch serão abordadas neste estudo. As seis primeiras vias foram escolhidas pois são importantes para a formação do SNC e foram amplamente estudadas e descritas em artigos de revisão. A via Notch foi escolhida pois os resultados obtidos têm relação com membros contidos nessa via.

1.3.1 Impacto da via do ácido retinoico (AR) no desenvolvimento do SNC

O ácido retinoico (AR) é uma molécula derivada da vitamina A e tem como forma biologicamente ativa o trans-ácido retinoico (44). Animais não são capazes de sintetizar a vitamina A e por isso dependem da ingestão de frutas e vegetais ricos em carotenóides para obtenção dessa substância. O AR atua na diferenciação do eixo anteroposterior e dorsoventral do SNC, principalmente causando efeito posteriorizador (6,42,43,45,46).

O AR liga-se a um heterodímero formado pelo receptor de ácido retinoico (RAR) e receptor de retinoide X (RXR) e esse complexo atua como fator de transcrição (44,46) (Figura 6). Os receptores RAR e RXR estão localizados no núcleo celular e se ligam a regiões específicas do DNA (ácido desoxirribonucléico), chamadas de elementos de resposta ao ácido retinoico (RARE) ou elementos de resposta ao retinoide X (RXRE). Esses elementos de resposta se encontram nas regiões promotoras de genes. Depois

que o AR ativa os receptores, ele volta ao citoplasma, onde é degradado, o que regula os níveis de AR (44,46).

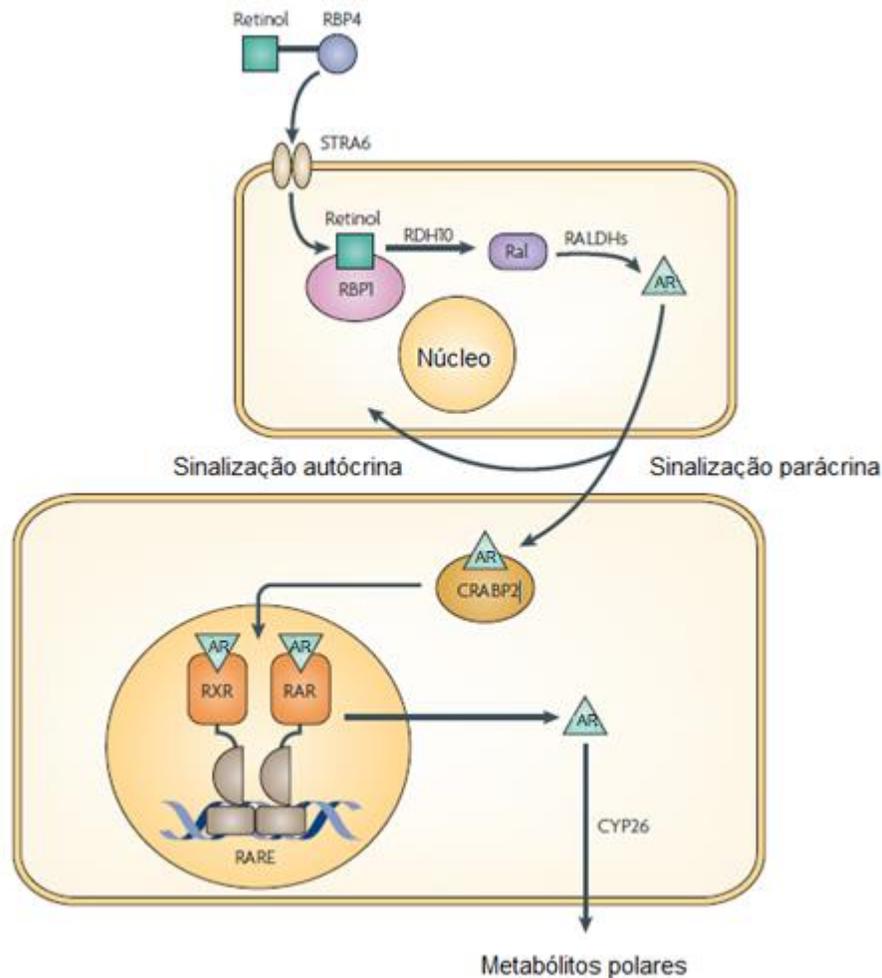


Figura 6. Vias envolvidas na geração, ação e degradação do AR. O retinol se liga à proteína RBP4 no plasma e entra na célula através do receptor STRA6. Dentro da célula, o retinol é metabolizado em AR. Ele pode ser transportado para o núcleo, onde se liga aos receptores RXR e RAR, que por sua vez se ligam a uma sequência específica no DNA, denominada RARE. Modificado de (46).

Existe uma quantidade ideal de AR para que haja a correta formação do SNC. O AR em excesso inibe a formação de estruturas neurais anteriores no SNC, como olhos e fossas nasais (45). O fenótipo também é observado em modelos animais com dietas deficientes em vitamina A (47). Quando em baixa quantidade, também foi descrita a

malformação das estruturas posteriores, como menor quantidade de rombômeros em embriões de codorna (48).

O AR também induz a diferenciação de vários tipos de neurônios e células da glia, através do controle da expressão de genes como os da família Wnt (43,46), homeobox (Hox5, por exemplo), *FGF* e *BMP*, exemplificando como as vias podem interagir umas com as outras (44).

1.3.2 Impacto da via do *Sonic Hedgehog* (SHH) no desenvolvimento do SNC

O gene *SHH* codifica uma molécula sinalizadora de curto e longo alcance, responsável pelo padrão do SNC, somitos e membros. É altamente conservado em mamíferos e seu estudo teve início a partir de sua semelhança ao gene *hedgehog*, de *Drosophila melanogaster* (49).

O morfógeno SHH contribui no padrão dorsoventral e mediolateral do SNC fetal. É produzido inicialmente pela placa precordal e pela notocorda (43,49), regulando a especificação medial e ventral do SNC. Posteriormente, o SHH passa a ser expresso também na linha média da placa neural e sua expressão se mantém ao longo do desenvolvimento do SNC (43,49–52). Defeitos na via do SHH estão associados com quadros de holoprosencefalia, devido à falha de desenvolvimento das estruturas da linha média ventral (33).

Alem do mais, o SHH possui atividade organizadora do prosencéfalo em camundongos (52). A atividade organizadora é definida como a capacidade de um grupo de células de induzir a diferenciação de células vizinhas, mudando o destino celular destas, e gerando um tecido com padrão em comum (51). Camundongos mutantes para o *SHH* e outros componentes desta via são usados em modelos de holoprosencefalia, indicando a importância desta para a separação correta dos hemisférios cerebrais (53).

1.3.3 Impacto da via do *BMP* no desenvolvimento do SNC

Os BMPs são um grupo de fatores de crescimento que foi originalmente descrito pela sua capacidade de indução de tecido ósseo e cartilaginoso (54–56). A família dos BMPs regula a lateralização e dorsalização do SNC, em contraste com o SHH (52). Os *BMPs* são expressos pela ectoderme não-neural, ou seja, pelas células que se diferenciarão em epiderme (6,52). Em contraste, as células da ectoderme neural expressam proteínas conhecidas como indutoras neurais, como Chordin e Noggin, que inativam o BMP ou seu receptor (56). Assim, a indução neural ocorre pela inativação da via do BMP e consequente prevenção da diferenciação da ectoderme em epiderme, permitindo a formação da ectoderme neural (6,55,56).

Apesar de inicialmente terem sido associados à formação do sistema ósseo e cartilaginoso, atualmente entende-se que os BMPs são essenciais durante a embriogênese e para a formação de diversos órgãos (55,56). Camundongos nocautes de *BMP2* ou *BMP4* apresentaram letalidade embrionária, enquanto nocaute de *BMP1*, *BMP7* ou *BMP11* causam morte logo após o nascimento. A expressão do gene *BMP4*, por exemplo, é essencial para a formação da mesoderme, o que explica a letalidade embrionária nos camundongos com esse gene inativado, ocorrendo o comprometido do desenvolvimento destes organismos desde processos como a gastrulação (55).

A expressão de *BMPs* é importante para a formação da linha média dorsal. Camundongos nocautes para os receptores BMP1a e BMP1b, não formam a bainha cortical nem o plexo coroide e apresentam holoprosencefalia (33,51,55). A bainha cortical é uma região organizadora do córtex cerebral e produz Wnt, além de BMP (57). Nestes modelos animais, houve também redução dos olhos e uma quantidade menor de embriões com ambas as mutações, indicando possível letalidade (33). Porém, não houve alteração na região ventral da linha média. Essa observação indica uma segunda etiologia para a holoprosencefalia, diferentemente da primeira hipótese, que se baseia em defeitos de SHH levando a um defeito de formação da linha média ventral. É possível que defeitos na via de sinalização do BMP desencadeiem defeitos de formação da linha média dorsal e contribua para o fenótipo (33).

Os BMPs contribuem de forma importante para o desenvolvimento de vários tecidos, não apenas do sistema ósseo ou nervoso, e atuam desde o início do desenvolvimento neural, induzindo a dorsalização do tubo neural, até processos mais tardios e complexos, como o desenvolvimento cortical e do olho (55).

Sabe-se que a via do BMP pode interagir com outras vias de sinalização. A interação mais profundamente estudada se dá com a via *Wnt*. Essas duas vias agem de forma antagônica na diferenciação de cartilagem articular, intestino e desenvolvimento do folículo capilar (56).

1.3.4 Impacto da via *Wnt* no desenvolvimento do SNC

Os genes da família *Wnt* codificam proteínas sinalizadoras que controlam vários processos do desenvolvimento animal e são altamente conservados em animais (58). Esses genes contribuem para todos os passos do desenvolvimento do SNC, desde o estabelecimento do eixo anteroposterior da placa neural, proliferação, diferenciação e migração das células-tronco neurais, até processos mais tardios, como desenvolvimento de axônios, dendritos e sinapses, neurogênese no SNC adulto e plasticidade sináptica (12,43,58).

Existem três vias moleculares de sinalização da via *Wnt*: a via canônica, a não-canônica e a de polaridade celular planar. Na via canônica, que é a mais estudada e bem descrita, há a ação de um coativador transcricional, a β -catenina, na denominada via “*Wnt*/ β -catenina” (12,58).

A diferença de concentração de *Wnt* contribui para a formação do eixo anteroposterior da placa neural, sendo mais expressa na região posterior que na anterior. Além disso, a via *Wnt* é importante para o correto fechamento do tubo neural. Em modelos animais nos quais genes da via *Wnt* encontravam-se inativados, defeitos de fechamento do tubo neural foram identificados (58).

Após a formação do tubo neural, os genes *WNT* participam na proliferação e especificação de células dorsais e suprimem a diferenciação de células ventrais (12,57,58). Além disso, os Wnts atuam na fase seguinte do desenvolvimento do SNC, quando há a formação das cinco vesículas encefálicas. Membros da família Wnt foram identificados como sendo expressos diferencialmente no telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo e medula espinhal (Figura 7). Estudos utilizando peixe-zebra e camundongos evidenciaram malformação de estruturas anteriores, como o prosencéfalo, após mutação em genes membros dessa via, como *Tcf3* e *Wnt8c* (58). Assim, os Wnts participam do desenvolvimento de estruturas formadas em estágios mais avançados da organização do SNC, como formação do córtex cerebral e hipocampo.

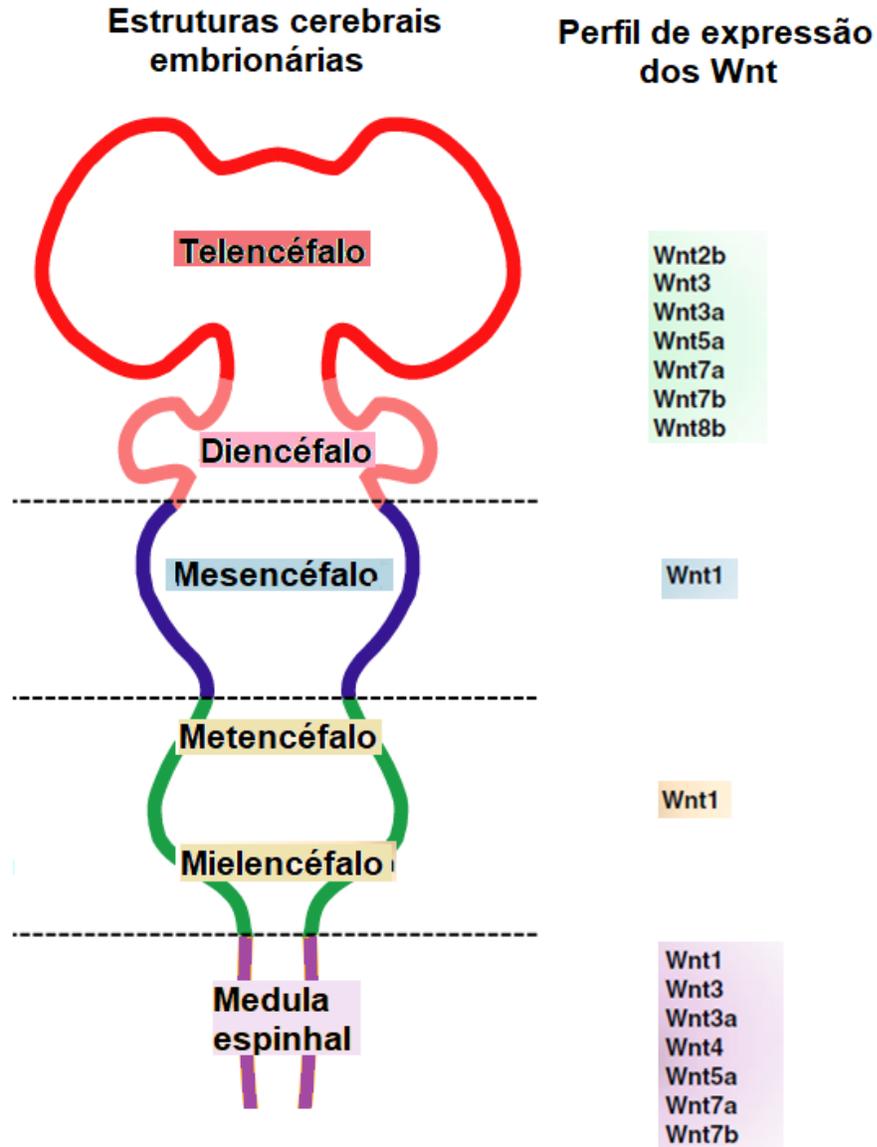


Figura 7. Perfil de expressão de Wnts durante o desenvolvimento cerebral em mamíferos. Modificado de (58).

A via *Wnt* e a via do *BMP* se relacionam de forma complementar, para que haja um equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação celular (59,60). Ativação da via *Wnt* induz a proliferação celular e inibe a diferenciação, enquanto ativação da via do *BMP* gera o efeito oposto (59). Essa interação entre as duas vias também foi observada em peixe-zebra e ratos, evidenciando a presença dessa regulação em diferentes espécies e indicando sua conservação ao longo da evolução (59,60). Estas duas vias estão

intimamente interligadas e são capazes de regular uma a outra, gerando um equilíbrio fino entre a proliferação e a diferenciação, como ilustrado no modelo da figura 8.

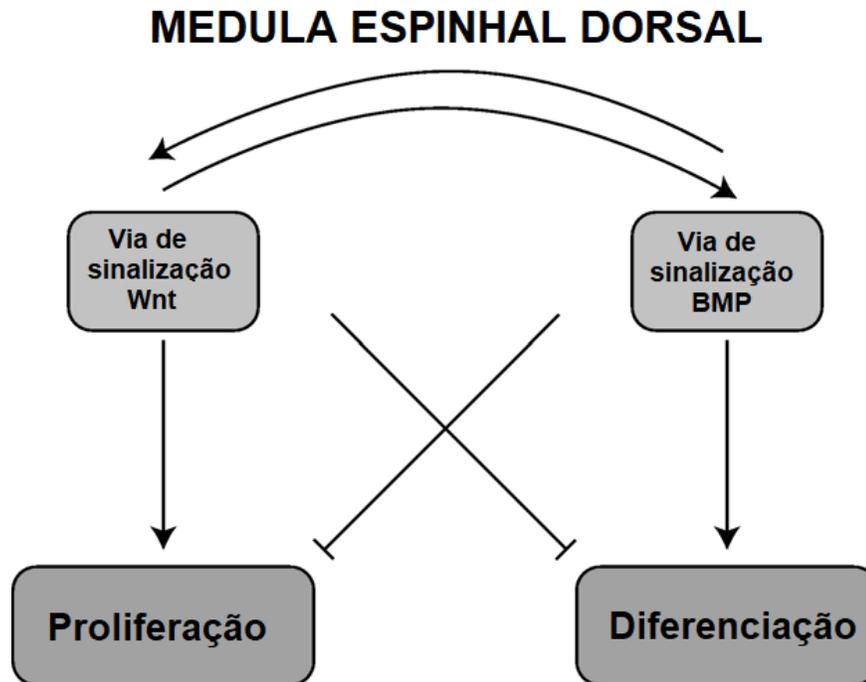


Figura 8. Modelo da regulação Wnt/BMP na medula espinhal. A via Wnt induz a proliferação e inibe a diferenciação. A via BMP induz a diferenciação e inibe a proliferação. Ambas as vias são capazes de regular a expressão uma da outra, ilustrado pelas setas curvas. Modificado de (59).

A família Wnt está presente durante toda a formação do SNC, induzindo a especificação, proliferação e migração neuronal e interagindo com as outras vias morfogênicas, principalmente a via do *BMP* (58).

1.3.5 Impacto da via do *FGF* no desenvolvimento do SNC

A família FGF (fator de crescimento de fibroblasto) é composta de proteínas sinalizadoras que regulam uma série de processos celulares, entre eles: proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular. Os FGFs atuam durante o

desenvolvimento embrionário, na formação de órgãos como pulmões, fígado, pâncreas, rim e cérebros, e também atuam durante a vida adulta, no reparo de tecidos (61).

O FGF é liberado por células da mesoderme e, assim como o AR, é responsável pela diferenciação do eixo anteroposterior do SNC (6,43,51,52). Membros da família FGF também são considerados mitógenos, induzindo a proliferação celular (62).

Altos níveis de FGF podem interagir com genes da família HOX, importantes para a localização celular no eixo anteroposterior. A mesoderme posterior expressa grandes quantidades de FGF e ativa os genes *HOXC5* ou *HOXB4*, enquanto a mesoderme anterior expressa baixas quantidades de FGF e ativa *HOXC9* e *HOXB9* (43).

O FGF, assim como o SHH, também é capaz de realizar atividade organizadora. O gene *FGF8*, em particular, foi associado com a formação do mesencéfalo (51,63). O gene *FGF8* também é considerado um mitógeno, induzindo a proliferação celular no SNC (62,63). Porém, altas concentrações de FGF8 induzem células à apoptose, sugerindo que o mitógeno é capaz de regular a quantidade de células através tanto da proliferação celular quanto da apoptose (62).

1.3.6 Genes *HOX*, *FOX* e *SOX*

Os fatores de transcrição HOXs são genes que possuem um homeodomínio (região conservada que se liga a uma sequência específica no DNA) altamente conservados em várias espécies, incluindo fungos, plantas e animais e sua família mais conhecida é a dos genes homeobox (*HOX*). Eles determinam o padrão de segmentação do embrião e são capazes de ativar ou reprimir a expressão gênica (10,11). Os genes *HOX* estão organizados no cromossomo na mesma ordem que agem para formar os segmentos do corpo, como ilustrado na figura 9, que também ilustra a semelhança e conservação desses genes entre humanos e *Drosophila* (64) (Figura 9).

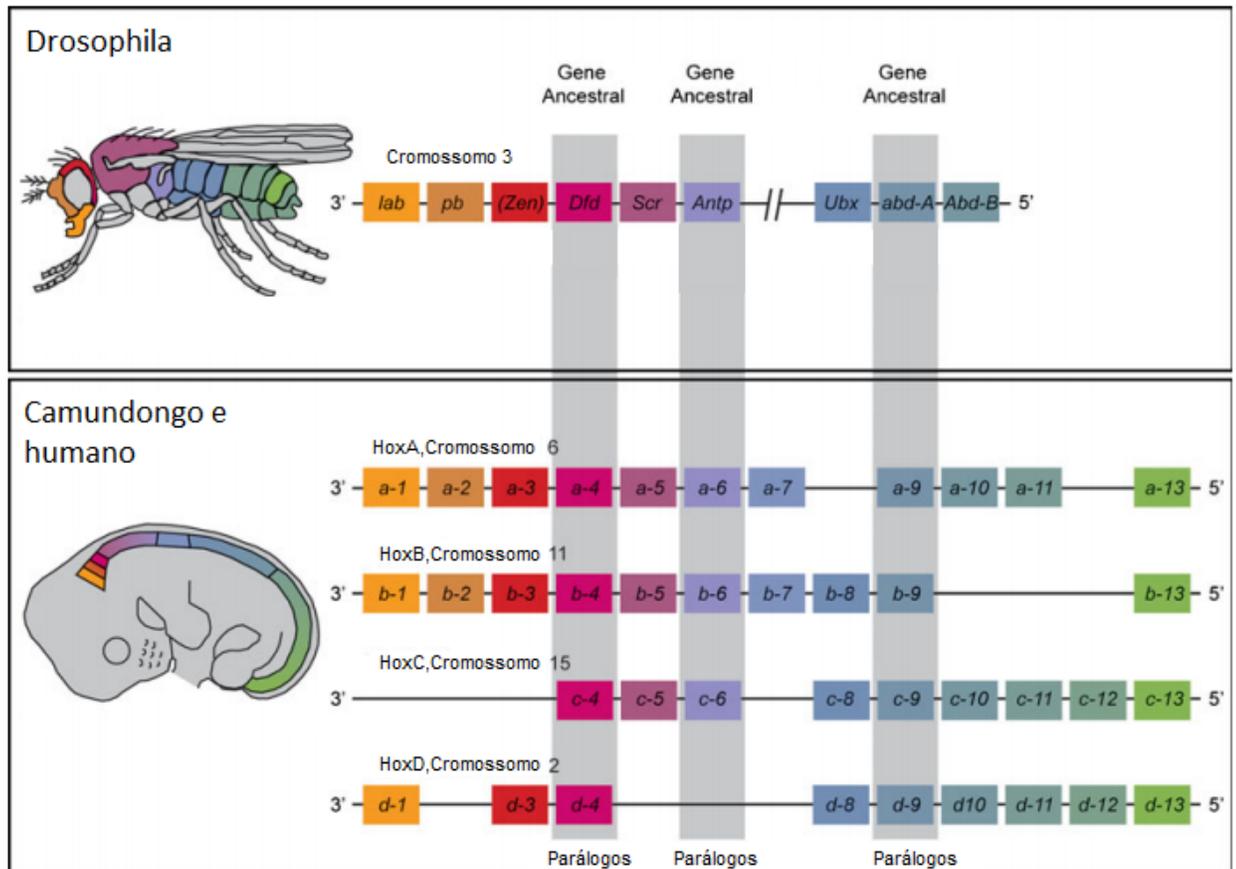


Figura 9. Esquema representando a posição de genes HOX no cromossomo em *Drosophila*, humanos e camundongos. Os genes em amarelo são expressos na região anterior e estão localizados mais terminalmente no cromossomo, enquanto genes expressos nas regiões mais caudais estão localizados em sequência. Modificado de (64).

A sequência consenso do homeodomínio foi definida primeiramente a partir de genes da família homeobox, em particular da *Antp*, de *D. Melanogaster*, mas o estudo de genes com esse domínio vem se expandindo e abrangendo novas classes de famílias. A sequência inicial era constituída por cerca de 60 aminoácidos, mas, atualmente, sabe-se que o homeodomínio pode variar, chegando a 3170 aminoácidos. Essa sequência possui um motivo “helix-turn-helix”, que possibilita a ligação com o DNA (10).

Há 39 genes da família HOX em vertebrados, organizados em 4 aglomerados, chamados de *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*. Desde sua descoberta inicial, os genes Hox foram associados ao desenvolvimento antero-posterior embrionário. Essa família de genes ficou conhecida como “homeótica”, pois mutações em *D. Melanogaster* faziam com que um segmento corporal se desenvolvesse no local de outro segmento. Ou seja, os genes *HOX* eram responsáveis pela organização morfológica da espécie. Dez genes

HOX já foram relacionados a doenças humanas, mas as doenças descritas são altamente heterogêneas, podendo se apresentar como síndromes dismórficas afetando vários sistemas até pacientes sem anormalidades que apresentam maior suscetibilidade a câncer de mama e próstata (65).

A família de genes Forkhead-box (*FOX*) adquiriu seu nome a partir do fenótipo observado em *D. Melanogaster*, que apresentava cabeça em forquilha. Participam de importantes processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, organogênese, regulação do ciclo celular, manutenção de células-tronco, controle metabólico e transdução de sinal (66). Em humanos já foram descritos pelo menos 43 membros e, assim como na família *HOX*, vários genes já foram associados a doenças (66,67). Como exemplo, mutações em *FOXG1* foram associados à síndrome de Rett e à síndrome do *FOXG1* (66).

Existem 20 genes descritos na família *SOX*, que foi descoberta durante uma pesquisa à procura do fator de determinação testicular, no cromossomo Y. O nome da família deriva de Sry-like high-mobility group (HMG) box. O HMG box é um domínio de ligação ao DNA e proteínas que apresentam esse domínio participam de processos associados com o enovelamento e desenrolamento da cromatina, como transcrição, replicação e reparo da fita de DNA. Os genes dessa família são considerados pleiotrópicos e regulam grupos de genes diferentes dependendo do contexto em que estão inseridos (68).

Os genes *SOX* codificam fatores de transcrição e são essenciais para a determinação de vários tipos celulares. O estudo da família *SOX* intensificou após a descoberta de que o *SOX2* era um componente de um complexo de fatores de transcrição capaz de converter células humanas e de camundongo em células-tronco pluripotentes induzidas. O *SOX2* também participa no desenvolvimento ocular, em conjunto com o *PAX6*, que é outro gene que possui homeodomínio e um dos mais estudados em relação à formação do olho (68).

Além dessas três famílias citadas, há outras classes de genes com homeodomínios que participam do desenvolvimento embrionário, incluindo o desenvolvimento do SNC, como por exemplo os genes da família *PAX* e *LIM* (10).

1.3.7 Impacto da via do *Notch/Delta* no desenvolvimento do SNC

A via de sinalização Notch/Delta é uma via evolutivamente conservada entre animais e envolvida nos processos de diferenciação, proliferação e apoptose (69,70). O gene *NOTCH* tem efeito pleiotrópico e a consequência da sinalização do Notch é dependente do contexto celular (71,72). O gene *DLL1* codifica a proteína Delta1, que é um membro da família Delta/Serrate/Jagged. Este gene, regulado pelo FGF, é expresso na região caudal ao nó de Hensen, inibindo a diferenciação neural (43).

As proteínas que se ligam ao Notch são capazes de inibir a diferenciação celular das células vizinhas através de um mecanismo de inibição lateral (73,74). Neste mecanismo, quando um precursor neural expressa uma proteína transmembrana ligante do Notch, como por exemplo a Delta1, essa proteína se liga ao receptor em células vizinhas e o domínio intracelular do Notch é clivado. Posteriormente, o domínio clivado integra o núcleo e ativa a transcrição de genes que irão suprimir a diferenciação celular em neurônio das células adjacentes (7,71,75) (Figura 10).

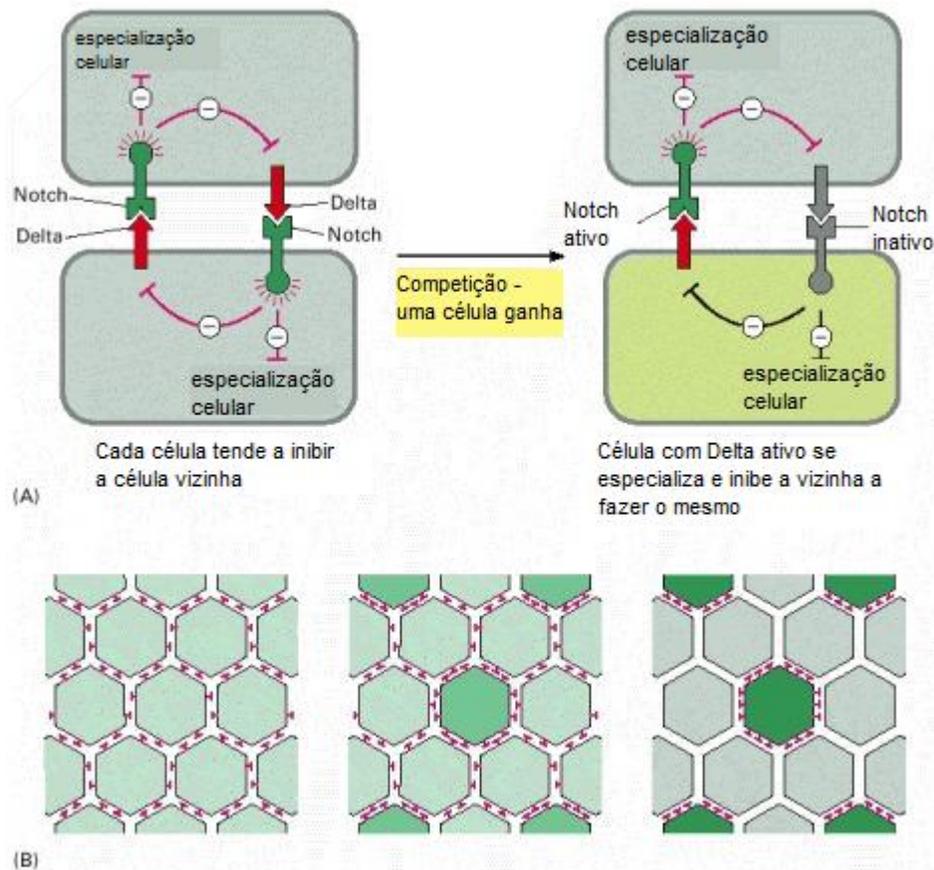


Figura 10. Esquema representando o processo de inibição lateral. A) O neurônio em desenvolvimento expressa uma proteína ligada à membrana, como por exemplo a Delta, que se liga a receptores Notch nas células vizinhas e inibe a diferenciação destas células em neurônios. Assim, a célula que expressa a Delta vai se diferenciar em neurônio enquanto as células adjacentes vão se manter como células epiteliais. B) De início, todas as células expressam Notch e Delta. Algumas células apresentam uma tendência a se especializar e, conseqüentemente, expressam um sinal inibitório maior, fazendo com que as células vizinhas não se diferenciem. Modificada de (76).

Tradicionalmente, a ativação de *NOTCH* no SNC de vertebrados é conhecida pela inibição da diferenciação celular e manutenção das células como progenitoras (75,77,78). Alterações morfológicas do SNC foram observadas em camundongos nocaute para diversos membros da via Notch. Entre esses membros, constam receptores Notch, ligantes, proteínas efetoras e moduladores de sinais (75).

O gene *NOTCH1* é expresso na placa neural, mas sua expressão é ainda mais elevada nas células da crista neural, indicando a importância dessa via na formação desse grupo celular que contribui para vários sistemas distintos (7). Estudos em camundongos nos quais *NOTCH1* e *NOTCH2* eram inativos, altos níveis de apoptose foram observados, com conseqüente morte embrionária (34,70,75,79).

A proteína DLL1 é expressa durante o desenvolvimento do prosencéfalo e a haploinsuficiência do gene *DLL1* foi associada à holoprosencefalia em humanos (34), indicando a contribuição da via Notch/Delta para a formação do SNC. Ademais, corroborando a hipótese de que a via de sinalização Notch inibe a diferenciação neuronal no SNC, camundongos *Dll1*^{-/-} apresentavam aumento de marcadores de diferenciação neuronal e diminuição da quantidade de marcadores de células progenitoras (75).

Estudos indicam que a função do Notch muda de acordo com o ligante. Por exemplo, enquanto DLL1 e o DLL3 são importantes para a somitogênese, JAG1 e JAG2 não afetam esse processo (80).

Por fim, um estudo recente identificou genes que potencializam o efeito de sinalização do Notch e parecem ser responsáveis pela expansão cortical em humanos. A expressão dos genes *NOTCH2NLA* e *NOTCH2NLB* está comprometida na síndrome microduplicação/microdeleção 1q21.1. Neste caso, o aumento na dosagem desses genes está associado à presença de macrocefalia, dado o aumento de células progenitoras e retardo na diferenciação das células em neurônios; enquanto a diminuição da expressão dos genes está associada à presença de microcefalia, originada pela diferenciação precoce de um número inicial menor de células em neurônios (77).

1.4 Fatores ambientais associados à ocorrência de malformações cerebrais

Uma parcela das alterações do desenvolvimento do SNC pode ser causada por fatores ambientais isolados, tais como pela exposição a substâncias teratogênicas, medicamentos, álcool ou tabaco (81–83), pela presença de quantidades insuficientes de nutrientes para o correto fechamento do tubo neural (29,30) e pela ocorrência de infecções virais (rubéola, zika) ou outros agentes biológicos (toxoplasmose, sífilis) durante a vida pré-natal (84,85). Nesses casos, não se tratam de malformações, mas de disrupções (24,86). Uma disrupção não é herdada, e pode ter sua causa identificada e

associada ao quadro (81–85). Por essa razão, é importante realizar uma história clínica detalhada, a fim de auxiliar na distinção entre uma malformação e uma disrupção.

É possível que fatores herdados atuem conferindo uma predisposição ao desenvolvimento anormal (84,86), entretanto, neste modelo multifatorial de herança, na ausência de um evento ambiental desencadeador de MC, o embrião se desenvolverá normalmente. A interação entre fatores genéticos de risco e eventos ambientais configura uma dificuldade na identificação da etiologia (genética ou não genética) das MCs. Por não ser o foco deste estudo, as causas não genéticas de anomalias cerebrais não serão abordadas. Excluímos os casos em que houvesse suspeitas de que a disrupção foi uma causa necessária da MC com base na história clínica do paciente, de acordo com o modelo causa-componente (87,88).

1.4 VARIAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNV) E SUA INVESTIGAÇÃO POR MEIO DE ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY

As variações no número de cópia (do inglês, *copy number variation* – CNVs) são regiões genômicas maiores ou iguais a 1 kb (quilo base) que estão presentes em maior ou menor número no DNA, comparado a um DNA de referência (89–92). Elas contribuem para a variabilidade genética em indivíduos e espécies evolutivamente próximas dos humanos e não são necessariamente patogênicas (91,93,94).

O estudo das CNVs e a descoberta de síndromes de microdeleções e microduplicações fez com que a investigação destas regiões fosse utilizada para o que se define como “fenótipo reverso”. No fenótipo reverso as CNVs são identificadas e posteriormente associadas a um fenótipo previamente descrito, caracterizando a região genômica que compõe a CNV como uma região candidata ao fenótipo (92,94–96).

É importante enfatizar que apenas a identificação de uma CNV não é o suficiente para se estabelecer uma relação genótipo-fenótipo precisa. É preciso também entender

o contexto estrutural daquela região, com seus promotores funcionais e reguladores transcricionais (95,97). Estudos sugerem que CNVs fora de genes ainda assim podem afetar a expressão de genes que estão a uma distância de 2 Mb (mega bases) (98,99).

Uma técnica amplamente utilizada para a detecção de CNVs é a CMA (análise cromossômica por *microarray*). Como síndromes de microdeleção e microduplicação têm grande variabilidade fenotípica, pesquisadores e clínicos passaram a usar a CMA como exame inicial, tirando vantagem da sua capacidade de investigar todo o genoma sem que haja uma hipótese inicial.

A CMA é uma técnica capaz de detectar perdas ou ganhos de material genético e sua resolução varia com o número de sondas utilizado (100,101). Esta técnica apresenta maior resolução que o cariótipo (102), não depende de cultura celular (103) e é capaz de avaliar todo o genoma, o que a caracteriza como uma boa técnica de investigação em casos em que não exista uma hipótese diagnóstica (102,104,105).

Atualmente, as sondas correspondem a um conjunto de oligonucleotídeos dispostos em uma estrutura física, de acordo com a tecnologia de cada fabricante. A CMA pode ser empregada em análises comparativas entre duas amostras (aCGH, ou hibridação genômica comparativa) e em análises comparativas entre uma amostra e uma população. A inclusão de SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*) no *array* permite a detecção de regiões de homozigose, sendo possível a detecção de dissomia uniparental e consanguinidade (101,105–107).

A resolução da CMA está no espectro entre as grandes alterações vistas pelo cariótipo e as mutações pequenas vistas por sequenciamento. A resolução da CMA pode chegar a 50 kb (92) e depende do número de sondas proposta por cada fabricante, podendo variar de 60 mil a mais de 2 milhões de sondas. O aumento da resolução é especialmente interessante para a investigação de regiões subteloméricas, que são ricas em genes (108). A CMA permite uma identificação mais precisa dos pontos de quebra e a determinação dos genes presentes na região da CNV, o que pode permitir o estabelecimento de correlação com o fenótipo (101).

Apesar da taxa de diagnóstico variar de acordo com a população estudada e com a plataforma utilizada, a CMA tem se mostrado uma boa técnica para identificar novos

rearranjos (92,94,96,100,109). Diversos estudos demonstraram a capacidade diagnóstica da técnica (92,110–112), incluindo uma meta-análise (113), que estima a taxa diagnóstica em torno de 10%, em pacientes com DI (deficiência intelectual) e anomalias congênitas. Outra meta-análise, focada em pacientes com DI, transtorno do espectro autista (TEA) ou múltiplas malformações, obteve uma taxa diagnóstica de 12%, bem maior que a taxa do cariótipo convencional, que foi de 3% (105). A capacidade de diagnóstico aumenta quando a população estudada possui um fenótipo/malformação bem definida. Por exemplo, um estudo focado em pacientes com agenesia de corpo caloso obteve uma taxa de diagnóstico de 24% (112).

CNVs patogênicas foram identificadas como causadoras de síndromes específicas nas quais MCs estão presentes, como Potocki-Lupski (dup17p11), DiGeorge (del22q11) e Phelan-McDermid (del22q13). Algumas CNVs são consideradas patogênicas, mas não foram associadas a quadros clínicos bem descritos (114). O quadro 1 apresenta algumas CNVs consideradas patogênicas em pacientes com as principais MCs mencionadas anteriormente.

Quadro 1 - Principais malformações cerebrais de acordo com as quatro classificações e CNVs associadas ao fenótipo

Defeitos de fechamento do tubo neural	CNV	Referência
Anencefalia	del 10p11	Gao et al. (2017)
Encefaloceles	del 12q21	Molin et al. (2013)
Espinha bífida (mielomeningocele, meningocele, espinha bífida oculta)	del 2q35, del 13q31, del 10p11, dup 2q13	Bassuk et al. (2013), Gao et al. (2017)
Defeitos de separação prosencefálica		
Holoprosencefalias (alobar, semilobar, lobar e displasia septo-óptica)	del 2p21, del 7q36, del 18p11, del 13q32, del 22q13, del 22q11, dup 17p11	Hu et al. (2018), Guy et al. (2015)
Defeitos de organogênese		
Agenesia total ou parcial do corpo caloso	del 11p13, del 21q11, del 4p16, del 8q12, del 8p23, del Xp22, del 6q27, del 3q13, dup 5p15, dup 3p24, dup 3q26	Oliveira (2015), Chen et al. (2015)
Malformação de Chiari (tipos I, II, III, e IV)	dup 22q11	Guy et al. (2015)
Malformação de Dandy-Walker e variante de Dandy-Walker	dup 17p11, dup 9p23	Schumann et al. (2016)
Defeitos de migração neuronal		
Polimicrogiria	del 6q27, del 1p36, del 22q11	Conti et al. (2013), Stutterd and Leventer (2014)
Lisencefalia (tipos I, II e III), paquiria ou agiria	del 17p13	Dobyns et al. (1991)
Heterotopia	del 6q27	Conti et al. (2013)
Esquizencefalia	del 8p23	Chen et al. (2015)
Megalencefalia e hemimegalencefalia	dup 15q13, dup 1q21	Cai et al. (2014), Wang et al. (2016)

1.5 JUSTIFICATIVA

Dados da OMS reportam que anomalias congênitas (definidas como malformações, anomalias cromossômicas, deformações e distúrbios metabólicos) são uma causa importante de mortes neonatais, ocorrendo entre 7% e 25% dos casos (115), sendo mais prevalentes em países com taxa de mortalidade infantil mais baixas. Os defeitos de fechamento de tubo neural são a segunda maior causa de morte neonatal, seguida da síndrome de Down (116).

O desenvolvimento cerebral é um processo complexo, que, quando alterado, pode induzir à ocorrência de MC. A etiologia genética das diversas MC existentes não é totalmente compreendida, tornando tal investigação necessária para a compreensão das vias biológicas e genes envolvidos neste processo. Com o auxílio de técnicas

moleculares, hoje é possível identificar CNVs em pacientes com MCs e estabelecer uma relação genótipo-fenótipo mais eficiente. O contínuo progresso molecular, somado à composição de bases de dados acessíveis mundialmente, permitem também a reclassificação de CNVs identificadas anteriormente, e cuja significância era incerta. Adicionalmente, a identificação de CNVs patogênicas tem um impacto direto no aconselhamento genético do paciente e sua família, além de contribuir para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais precisas. Ainda, um diagnóstico preciso pode aliviar a ansiedade dos pais e facilitar a conexão com associações e grupos de apoio (117).

Pesquisas que contribuem com a melhoria do entendimento sobre as etiologias da MC são essenciais, não somente por seu cunho de conhecimento científico, mas também a fim de que um país possa planejar a implementação de políticas públicas voltadas à atenção dos pacientes e de suas famílias. A técnica da CMA foi escolhida para este estudo por haver evidências de sua eficiência na detecção de CNVs, além de outras alterações como mosaicismos de baixa quantidade e perda de heterozigose, que fazem com que seja a análise seja mais robusta (102,112).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto é identificar regiões genômicas associadas a malformações cerebrais através da análise de alterações cromossômicas submicroscópicas por CMA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar alterações submicroscópicas através da CMA e estabelecer sua contribuição para o quadro clínico dos pacientes.
- 2) Analisar molecularmente as regiões genômicas alteradas em cada paciente, identificando todos os genes codificantes compreendidos em cada alteração, e sua possível contribuição para o fenótipo observado.
- 3) Realizar uma correlação entre o tamanho e a composição de cada alteração com as características clínicas dos pacientes.
- 4) Propor novos genes candidatos às MCs, quando possível.
- 5) Identificar a taxa diagnóstica da CMA em casos de pacientes com MCs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 GRUPO AMOSTRAL E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes que fazem parte desse estudo foram selecionados nos anos de 2017 e 2018 no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Brasília-DF e na Instituição Vila São José Bento Cottolengo (VSJBC), Trindade-GO. Ao todo, foram selecionados 21 pacientes de ambos os sexos portadores de MC, sem diagnóstico de síndrome genética definida. Os pacientes foram divididos em dois grupos, segundo a origem:

Grupo 1: composto por 11 pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do HUB, em Brasília-DF, nos anos de 2017 e 2018. Para esses pacientes o cariótipo foi realizado como exame de rotina, além do teste para síndrome do X-frágil nos pacientes do sexo masculino. Os pacientes incluídos no estudo apresentavam resultado sem alterações em ambos os exames.

Durante a consulta, o médico geneticista ou o pesquisador expôs os objetivos da pesquisa, assim como os riscos da participação no projeto, para os responsáveis legais, que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A) e autorização de uso de imagem. Não foi oferecido termo de assentimento para os pacientes com coocorrência de DI.

Para este grupo, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM/UnB – Parecer nº 2.261.862) (Anexo B).

Grupo 2: composto por 10 pacientes do VSJBC, em Trindade-GO. Pacientes deste grupo possuem acometimento mais graves, tanto do ponto de vista das MCs quanto do ponto de vista cognitivo e se encontram institucionalizados no VSJBC, sob tutela e guarda da instituição. O VSJBC possui seu próprio TCLE (Anexo C), que, neste caso, foi

assinado pelos gestores da instituição. No caso dos pacientes que ainda possuíam vínculo familiar, os responsáveis foram contactados e apresentados à pesquisa.

Para os pacientes do grupo 2, o projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG – Protocolo nº 43743715.1.0000.5083) (Anexo D).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Assinatura do TCLE pelo responsável.
- Exame de imagem, sendo RM (ressonância magnética) ou TC (tomografia computadorizada) de crânio que evidencie malformações cerebrais.
- Cariótipo e exame de X-frágil (para pacientes do sexo masculino) sem alterações.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Síndrome genética diagnosticada.
- Hipótese diagnóstica de interrupção, através de relato da história clínica, em que tenha ocorrido infecções ou exposição a substâncias que possam explicar o quadro clínico do paciente.

3.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS

Foram coletadas duas amostras de sangue periférico por punção venosa de cada paciente: Uma em tubo contendo heparina, para exame de cariótipo e uma em tubo contendo ácido etileno diamina tetracético (EDTA) destinada à extração de DNA para realização dos exames moleculares (X-frágil e/ou CMA).

3.4.1 Cariótipo

No laboratório, foi feita a semeadura de linfócitos com 1 mL de sangue em meio de cultura (8 mL de meio RPMI puro, 1,5 mL de soro fetal bovino, 300 µL fitohemaglutinina, 100 µL de L-Glutamina e 100 µL de antibiótico (Penicilina e streptomicina)).

Após 72 h de cultivo em estufa a 37° C, 100 µL de colchicina foi adicionada às amostras. A colchicina bloqueia a divisão celular na metáfase, permitindo a observação dos cromossomos em seu estado mais condensado. Após 45 minutos, as células foram hipotonizadas com solução KCl (0,075M) e, 20 minutos depois, fixadas com Fixador de Carnoy (3:1 Metanol/Ácido Acético Glacial). As amostras foram gotejadas em lâminas de vidro e para cada paciente foram preparadas nove lâminas. Oito lâminas foram coradas com Giemsa, seguindo o protocolo para bandeamento G, enquanto a lâmina restante passou pelo protocolo para bandeamento C.

As amostras foram analisadas ao microscópio óptico para exclusão de alterações numéricas ou estruturais. A análise e a descrição dos cariótipos foram realizadas conforme as indicações do International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (118).

3.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA PARA EXAMES MOLECULARES

A extração de DNA foi realizada pelo método Puregene (*Qiagen*), seguindo recomendação do fabricante. Foram utilizados 3 mL de sangue total coletado em tubo com EDTA e as células foram lisadas com 9 mL de solução de lise RBC (5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação, retirada do sobrenadante e ressuspensão, foram adicionadas 3 mL de solução de lise celular (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS). Após centrifugação e retirada do sobrenadante, foi adicionado 1 mL da solução de precipitação de proteína (7,5 M de NH₄Ac). A amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon com 3 mL de isopropanol 100% e centrifugado. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 3 mL de etanol 70% ao pellet. O pellet foi seco a temperatura ambiente por 15 minutos e hidratado com 200-250 µL de tampão TE 1X por 12-24 horas ou incubado a 65° C por 1 hora. O DNA extraído foi armazenado entre 2° C e 8° C.

3.4.3 Exame do X-Frágil

A PCR foi feita com 3 µL de DNA extraído (ver item 3.4.2) e 22 µL de mix (6,9 µL de água, 0,7 µL primer pC, 0,7 µL primer pF, 10,0 µL Q solution, 2,5 µL Buffer, 1,0 dNTP e 0,2 µL taq). Cinco µL da amostra mais 3 µL de corante foram adicionadas a um gel de 1,5% agarose e as amostras correram por aproximadamente 45 minutos a 100 V e 62 mA. O resultado negativo normal é evidenciado pela presença de uma banda, enquanto o positivo se faz pela ausência desta banda, devido à incapacidade de amplificação de regiões repetitivas muito grandes.

3.4.4 Análise Cromossômica por Microarray

Neste projeto foi utilizada a plataforma CytoScan™ 750k (Affymetrix), que possui 750.000 sondas, sendo 550.000 de regiões não-polimórficas e 200.000 de marcadores de SNPs. As sondas são fragmentos de DNA com sequências específicas e conhecidas, que cobrem todo o genoma e hibridam com a amostra. As sondas são fixadas num suporte físico chamado GeneChip® (Figura 11).

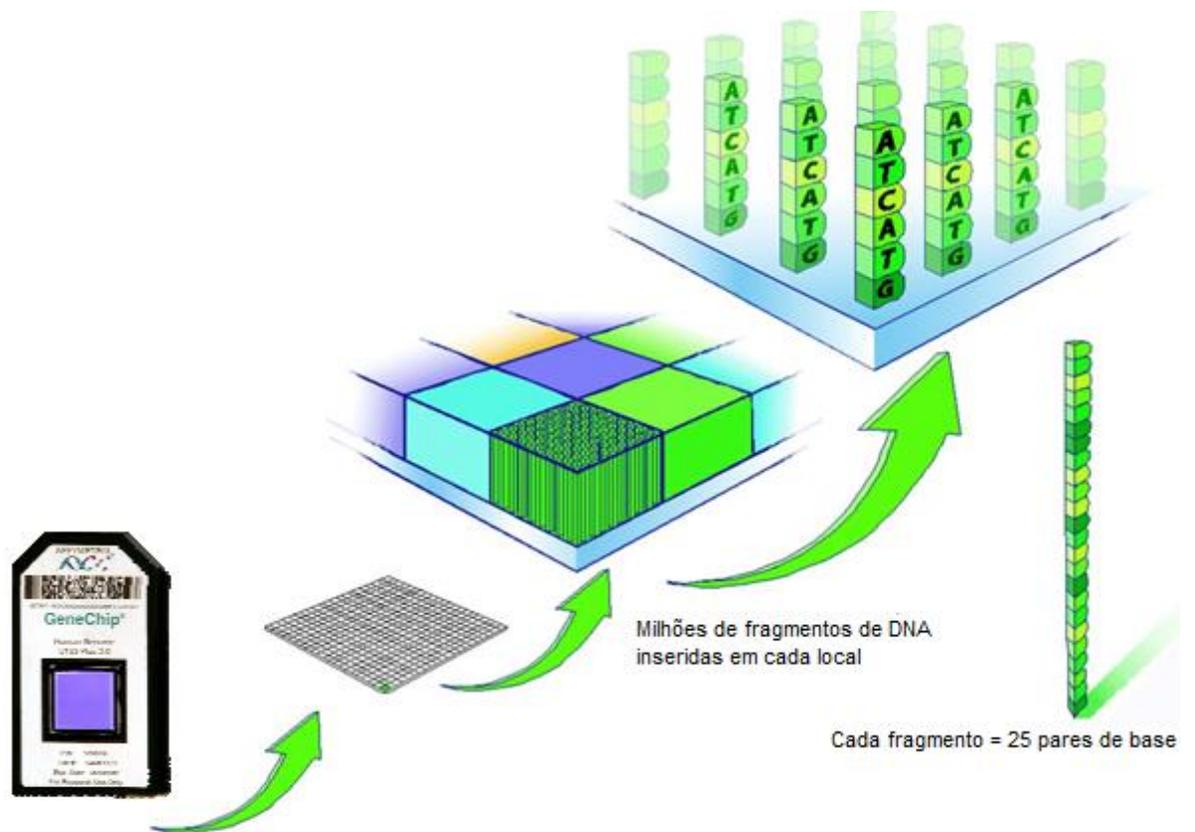


Figura 11. Esquema representado o GeneChip® com suas sondas. O DNA extraído se liga aos fragmentos de DNA de sequência conhecida e são detectados através de fluorescência. Modificado de (119).

A técnica de CMA é capaz de detectar, além de ganhos e perdas no material genético, mosaicismos de baixa quantidade e regiões de perda de heterozigose (102). Para caracterizar uma deleção, foi considerada a diminuição da fluorescência detectada

em pelo menos 15 sondas consecutivas, e para se confirmar duplicação, foram considerados os sinais fluorescentes de 30 sondas consecutivas.

Para o preparo da lâmina, foram utilizados 5 μ L (50 ng/mL) de DNA de cada paciente. As amostras foram digeridas pela enzima de restrição Nsp I e ligadas a adaptadores. Para o estágio de ligação, as amostras foram colocadas no termociclador, que foi programado para realizar um ciclo de 16°C (3 horas), um ciclo de 70°C (20 minutos) e diminuição da temperatura até chegar a 4° C.

Em seguida foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase). Um primer universal que reconhece a sequência do adaptador ligado à amostra de DNA foi utilizado para amplificar as sequências. O termociclador foi programado para realizar um ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos). A reação foi otimizada para amplificar preferencialmente fragmentos de 150 – 2.000 pares de bases. Em seguida, os produtos foram purificados utilizando *beads* magnéticas.

Após a lavagem para retiradas das *beads*, o material foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). Cada amostra apresentou valores de concentração de DNA maiores ou iguais a 3.0 μ g/ μ L. Em seguida, as amostras purificadas foram fragmentadas em fragmentos de 50 a- 200 pb (pares de base). Após, o reagente de fragmentação é adicionado às amostras, que são colocadas no termociclador. O protocolo de fragmentação do termociclador consiste em um ciclo de 37°C (35 minutos), um ciclo de 95°C (15 minutos) e diminuição da temperatura até chegar a 4° C.

Em seguida, os fragmentos de DNA foram marcados utilizando o reagente de marcação de DNA, o tampão TdT e a enzima TdT. O protocolo de marcação do termociclador consiste em um ciclo de 37°C (4 horas), um ciclo de 95°C (15 minutos) e diminuição da temperatura até chegar a 4° C. A solução de hibridização foi preparada e adicionada às amostras, que foram inseridas no termociclador para um ciclo de 95°C (10 minutos) e mantidas a 49° C até aplicação no GeneChip®. 200 μ L de amostra foram aplicados no *Affymetrix* GeneChip® e hibridados por 16 - 18 horas a 50° C a 60 rpm no GeneChip® Hybridization Oven 645 (*Affymetrix*).

Por fim, os chips foram lavados na estação automatizada Fluidics Station 450 (*Affymetrix*, EUA) e marcados com fluoróforo. Os chips foram escaneados utilizando o scanner GeneChip® Scanner 3000 7G (*Affymetrix*,) e os dados obtidos foram analisados utilizando o Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software versão 3.0 (*Affymetrix*). Além do ChAS, foram utilizados os bancos de dados DGV (do inglês, *Database of Genomic Variants*), DECIPHER (do inglês, *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*) e OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*) para avaliar a patogenicidade das alterações encontradas.

3.4.5 Classificação e Interpretação das CNVs

Nesse estudo, usaremos para classificação e interpretação das CNVs o modelo proposto por Miller et al. (2010)(105), que é bastante próximo do guia proposto pelo Colégio Americano de Genética Clínica, e classifica as CNVs em patôgena, possivelmente patogênica, variante de significado incerto (VOUS, do inglês, *Variants of Unknown Significance*), possivelmente benigna e benigna. O quadro 2 exemplifica certas estratégias para interpretação das CNVs.

Quadro 2 - Estratégias para interpretação de CNVs. Modificado de (105).

Critérios Primários	Indicam que a CNV é provavelmente	
	Patogênica	Benigna
1. A. CNV idêntica herdada de progenitor saudável		✓
B. CNV expandida ou alterada herdada do progenitor	✓	
C. CNV idêntica herdada de progenitor afetado	✓	
2. A. CNV similar herdada de progenitor saudável		✓
B. CNV similar herdada de progenitor afetado	✓	
3. CNV completamente contida em uma região de desbalanceamento genômico em um banco de dados de pacientes saudáveis		✓
4. CNV sobrepõe uma região de desbalanceamento genômico em um banco de dados de pacientes afetados	✓	
5. CNV sobrepõe coordenadas genômicas de síndromes conhecidas	✓	
6. CNA contém genes OMIM mórbidos	✓	
7. A. CNV é uma região rica em genes	✓	
B. CNV é uma região pobre em genes		✓
Achados Gerais		
1. A. CNV é uma deleção	✓	
B. CNV é uma deleção em homozigose	✓	
2. A. CNV é uma duplicação (sem genes sensíveis à dosagem)		✓
B. CNV é uma amplificação (ganho de mais de uma cópia)	✓	
3. CNV não contém elementos regulatórios conhecidos		✓

Alguns fatores gerais importantes para a interpretação da patogenicidade de uma CNV são: tamanho, localização, número de cópias (duplicação ou deleção, em homozigose ou heterozigose) genes contidos na região afetada (92,107,120), a baixa frequência na população saudável e ser uma CNV *de novo* (94).

A classificação das CNVs depende de vários fatores combinados, mas, de forma resumida, as CNVs foram consideradas patogênicas se maiores de 4 Mb, contendo genes descritos na plataforma OMIM associados ao fenótipo do paciente ou se a CNV era herdada de um genitor afetado. As CNVs foram consideradas VOUS se menores de 4 Mb, contendo poucos genes ou genes ainda não descritos em bancos de dados como causadores de doenças ou herdada de um progenitor saudável.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 TAXA DE DIAGNÓSTICO

No presente estudo, considerando os 21 pacientes dos dois grupos, 13 tiveram CMA com alterações (38%). Os outros 8 pacientes apresentavam alterações consideradas benignas ou possivelmente benignas. A taxa de diagnóstico foi de 23,8% (5/21) e a taxa de VOUS, de 14,3% (3/21) (Gráfico 1).

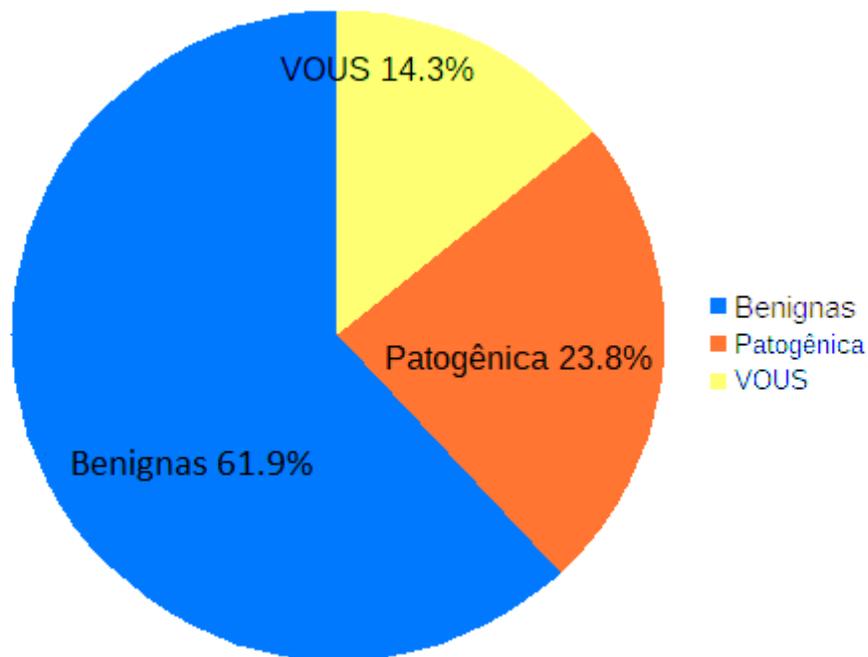


Gráfico 1. Pacientes com CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas (laranja), VOUS (amarelo) e benignas na CMA (azul), considerando os dois grupos.

No grupo 1, a taxa de diagnóstico de CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas foi de 18% (2/11), enquanto no grupo 2 foi de 30% (3/10). A taxa de VOUS detectadas no grupo 1 foi de 9% (1/11), e no grupo 2, de 20% (2/10).

Essa taxa de diagnóstico está de acordo com a obtida por Oliveira (2015) (112), no qual foram identificadas CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas em 24% dos pacientes com malformação do corpo caloso.

Na tabela 1 estão listadas as informações sobre as CNVs detectadas neste estudo.

Tabela 1 - Descrição das MCs encontrada nos pacientes, tipo de CNVs, coordenadas genômicas e classificação encontradas nos pacientes

Paciente	Malformação cerebral	Coordenadas genômicas	Tipo de CNV	Tamanho da CNV (kbps)	Classificação da CNV
HUB1	Hidrocefalia com redução da substância branca periventricular, redução volumétrica do mesencéfalo	arr[hg19] 6q27(170,589,000-170,914,297)x1	del	325	Patogênica
HUB2	Afilamento difuso do corpo caloso, mesencéfalo e do restante do tronco cerebral	arr[hg19] 9q34.3(140,677,600-140,796,849)x1	del	120	Patogênica
HUB3	Variante de Dandy Walker: hipoplasia de parte do verme cerebelar, comunicando porção posterior do 4º ventrículo com cisterna magna alargada	arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,997,928-23,650,871)x1	del	653	VOUS
SC1	Holoprosencefalia alobar, microcefalia	arr[hg19] 9p24.3(607,900-706,265)x1	del	98	Potencialmente patogênica
SC2	Paquigiria, agenesia de septo pelúcido, microcefalia	arr[hg19] 11q23.3(118,768,268-118,997,828)x3	dup	229	Potencialmente patogênica
		arr[hg19] 3q29(197,451,713-197,643,460)x3	dup	192	Potencialmente patogênica

Continua

Tabela 1 – Descrição das MCs encontrada nos pacientes, tipo de CNVs, coordenadas genômicas e classificação encontradas nos pacientes

Paciente	Malformação cerebral	Coordenadas genômicas	Tipo de CNV	Tamanho da CNV (kbps)	Classificação da CNV
SC3	Hidrocefalia congênita: DVP, acentuada hidrocele supratentorial, encefalomalácia, apagamento de sulcos e fissuras corticais. Mielomeningocele	arr[hg19] 1q21.1q21.2(145,764,678- 148,520,164)x1	del	2.700	Patogênica
SC4	Agenesia de septo pelúcido, hidrocefalia supratentorial, com sinais de hipertensão associada	arr[hg19] 2q12.2q12.3(106,884,820- 108,440,138)x1	del	1.500	VOUS
SC5	Desproporção craniofacial, com sinal de redução volumétrica encefálica	arr[hg19] 12p13.33(1,317,638- 1,627,395)x3	dup	310	VOUS
		arr[hg19] 12p13.33(1,190,349- 1,291,079)x3	dup	101	VOUS

Legenda: del = deleção; dup = duplicação; VOUS = variante de significado incerto; CNV = variações no número de cópias; DVP = derivação ventrículo-peritoneal.

Assim, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a CMA é um método eficiente para investigar a etiologia genética de malformações do SNC.

4.2 PACIENTES COM ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS

4.2.1 Paciente HUB1

Paciente do sexo feminino, primeira filha de pais não consanguíneos, foi encaminhada por malformações cerebrais vistas através de TC de crânio realizada aos 3 anos de idade, que evidenciou hidrocefalia, inversão incompleta de hipocampos, redução do volume mesencefálico e da matéria branca peritrigonal. Aos 6 anos, RM de crânio evidenciou heterotopia subependimária, hipoplasia de verme cerebelar, dilatação do sistema ventricular supratentorial, persistência do corno de Vengal e hipocampos simétricos com forma preservada.

A paciente nasceu a termo com medidas normais e teve marcos do desenvolvimento dentro dos padrões da normalidade, apenas com atraso na fala.

Ao exame físico, apresentava dismorfias leves: baixa implantação de cabelos na região temporal, epicanto, ponta nasal bulbosa, filtro curto, lábios grossos, palato alto e orelhas proeminentes. Radiografia panorâmica evidenciou agenesia de dois pré-molares: 15 e 35. Tem comportamento autista, não sabe ler e apenas escreve o próprio nome. Nunca teve crise convulsiva.

A CMA identificou uma deleção de 325 kbps no cromossomo 6: arr[hg19] 6q27(170,589,000-170,914,297) x1 (Figura 12). Essa região contém seis genes: *DLL1*, *FAM120B*, *MIR4644*, *PSMB1*, *TBP* e *PDCD2*.



Figura 12. Resultado de exame de CMA da paciente HUB1 (A) e de sua mãe (B), visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 6 (barras vermelhas na parte superior) que possui aproximadamente 325 kbps.

Exame realizado nos pais revelou que a alteração foi herdada de sua mãe, que não apresenta malformações cerebrais, confirmada por RM, mas que apresenta DI moderada. O exame físico da mãe evidenciou dismorfias faciais diferentes das da paciente. A mãe apresenta braquicefalia, testa alta e chata, nariz com ponta levemente bulbosa, filtro médio, lábios finos, retrognatia e dedos afilados. Ela relatou que terminou o ensino fundamental, tem dificuldade de aprendizado. De acordo com ela, é capaz de ler e escrever, mas tem dificuldade com palavras difíceis e matemática.

Além da paciente HUB1, a mãe tem outras duas filhas com o mesmo parceiro. Ambas são mais novas e uma delas também apresentava dificuldade de aprendizado. Essa irmã foi investigada pelo serviço de Genética do HUB, apresentando resultado negativo na CMA. Portanto, apenas uma de suas três filhas herdou a deleção.

A deleção de 325 kbps no cromossomo 6 contém seis genes: *DLL1*, *FAM120B*, *MIR4644*, *PSMB1*, *TBP* e *PDCD2*. Cinco desses genes são genes descritos na plataforma OMIM, enquanto o *MIR4644* é um miRNA. Apenas o gene *TBP* (OMIM #600075) já foi associado a uma doença, a ataxia espinocerebelar tipo 17.

Outros pacientes já foram descritos com deleções na região 6q27 e, com base em suas características clínicas e respectivas deleções, alguns autores tentaram definir uma região mínima crítica que pode variar de acordo com o grupo de pacientes investigado (38,110). A região definida por Peddibhotla e colaboradores (2015) (110) compreende uma região subtelomérica de 1,7 Mb e inclui os genes: *THBS2*, *WDR27*, *PHF10*, *TCTE3*, *ERMARD*, *LOC154449*, *DLL1*, *FAM120B*, *PSMB1*, *TBP* e *PDCD2* (110). Os autores sugerem *DLL1*, *THBS2*, *PHF10* e *ERMARD* como os melhores candidatos para as MCs. Já o estudo de Conti e colaboradores (2013)(38) definem a região crítica como um segmento de 1,2 Mb, intersticial, que inclui os genes: *THBS2*, *WDR27*, *PHF10*, *TCTE3*, *ERMARD*, *LOC154449* e *DLL1* (38). Por fim, a menor região crítica, definida por Eash e colaboradores (2005) (121), possui 0,4 Mb e inclui apenas três genes: *PSMB1*, *TBP* e *PDCD2*.

Na paciente aqui descrita, o gene *DLL1* parece o melhor candidato para explicar o fenótipo observado, uma vez que a proteína Delta-like protein 1 codificada por ele, por meio de ligação ao receptor Notch, é responsável por induzir a diferenciação de precursores neurais em neurônios (122). Em camundongos, a proteína Delta-like protein 1 é necessária para a formação de somitos e nocaute de *DLL1* em homozigose é letal (123). Em vertebrados, as células que expressam a DELTA1 são precursoras neurais e inibem a diferenciação das células vizinhas, através da ligação da DELTA1 no receptor Notch dessas células. Após ativação do receptor Notch, essas células deixam de se diferenciar em neurônios e assumem a função proliferativa. Dupé e colaboradores (2011) em um estudo que investigou a relação entre o gene *DLL1* e holoprosencefalia, realizaram uma avaliação comparativa usando ferramentas de bioinformática e concluíram que o gene *DLL1* era o melhor candidato para a holoprosencefalia (34). Além disso, o estudo descreveu a associação da holoprosencefalia com uma mutação de 3 pares de base em uma região conservada de um éxon de *DLL1* que resulta na troca de dois aminoácidos.

Em camundongos, a haploinsuficiência do *DLL1* foi associada a alterações no sistema imunológico, metabolismo e balanço energético, sem que houvessem MCs (124).

O gene *DLL1* parece atuar em conjunto com outros genes adjacentes na região 6q27. Os genes *DLL1* e *ERMARD* foram associados ao fenótipo de heterotopia

periventricular nodular (PNH), com uma aparentemente maior contribuição de *ERMARD* para este fenótipo (38). Entretanto, é possível que o gene *DLL1* contribua de forma significativa para o fenótipo de PNH, uma vez que portadores da deleção 6q27 que não incluem o gene *ERMARD*, como no caso da paciente aqui avaliada, também apresentam tal MC. O envolvimento destes genes na hipoplasia de corpo caloso também foi sugerida por Oliveira (2015) (112), em paciente com deleção de 2,7 Mb que envolve 22 genes, dentre eles *ERMARD* e *DLL1*.

Além do gene *DLL1*, outros genes parecem atuar no desenvolvimento cerebral e estarem associados às MCs observadas na paciente. O *TBP* codifica um fator de transcrição que se liga ao TATA-box e inicia a transcrição. Na base de dados OMIM, o gene foi associado à ataxia espinocerebelar 17. Rooms et al. (2006) (125) descreveram gêmeos monozigóticos que apresentavam epilepsia generalizada, cisterna magna aumentada e colpocefalia. Os pacientes tinham uma deleção envolvendo os genes *PDCD2*, *PSMB1*, *TBP* e *DLL1*. Os pesquisadores sugerem que a haploinsuficiência do *TBP* é a causa do quadro clínico. Eles descobriram alta expressão do *TBP* em regiões do cérebro em humanos e uma avaliação dos linfócitos dos pacientes evidenciou a diminuição da expressão de *TBP* pela metade.

Contribuindo para a hipótese de que o *TBP* é importante para a formação do SNC, um estudo feito com camundongos nocaute observou que os indivíduos homozigotos para o nocaute não eram viáveis, enquanto os heterozigotos aparentavam fenótipo normal (126).

O gene *PSMB1* codifica uma subunidade de um complexo de proteassoma (127). O proteassoma foi relacionado a vários processos além de degradação de proteínas, como regulação do ciclo celular, apresentação de antígeno e resposta à inflamação (128). É possível que a ubiquitinação seja importante para a ativação do Notch, considerando que a deleção de 3 pares de bases no gene *DLL1* afetava 2 aminoácidos em uma região conservada com motivo de ubiquitinação, em um paciente com holoprosencefalia semilobar (34).

Além disso, defeitos de tubo neural foram observados em camundongos nocaute para genes que codificam E3 ubiquitina ligases, sugerindo a importância da ubiquitinação para a neurulação (129). Um duplo nocaute de *SMURF1* e *SMURF2* apresentava

cranioraquisquise, que é a forma mais grave de defeito de fechamento do tubo neural, em que a falha do fechamento ocorre tanto no cérebro quanto na medula espinhal (129,130). Essas duas proteínas participam da via de sinalização de polaridade celular planar da via Wnt (130).

O gene *PDCD2* está associado a apoptose e é expresso em todos os tecidos humanos (131). Também foi descrito como responsável pela patogênese de linfomas de células B e T (132). Os genes *PDCD2*, *PSMB1* e *TBP* encontram-se fisicamente próximos e é possível que eles estejam associados com MCs graças a essa interação, tendo em vista a menor probabilidade de separação de genes próximos no DNA durante a meiose, também conhecido como linkage genético (125,133).

O gene *FAM120B*, também descrito na plataforma OMIM, apresenta poucos estudos na literatura. Este gene é expresso em todos os tecidos de camundongos adultos (134), se liga ao RXR-alfa e ao receptor-alfa de estrógeno e parece promover a adipogênese (135).

O único gene presente na deleção 6q27 da paciente que não está registrado na base de dados OMIM é *MIR4644*, que codifica um miRNA. Os miRNAs são responsáveis pelo silenciamento gênico (136,137) causando, possivelmente, mudanças no fenótipo de indivíduos por meio de desregulação da expressão de outros genes. O único estudo presente na literatura que investigou a ação deste miRNA o classifica como potencial biomarcador para câncer de pâncreas e vesícula biliar (138).

Assim, apesar de não podermos descartar a contribuição dos outros genes na região, o gene *DLL1* parece o gene candidato mais associado às MCs observadas na paciente. No entanto, a menor deleção na região 6q27 descrita até o momento, identificada por meio da técnica de hibridização fluorescente in situ (FISH), compreende apenas três genes: *PSMB1*, *TBP* e *PDCD2*, não incluindo o gene *DLL1* (121). Uma hipótese capaz de explicar uma perda de função de *DLL1* neste paciente, descrito por Eash e colaboradores, seria um possível efeito de posição, induzindo à uma diminuição na expressão do gene *DLL1*. Um estudo realizado por Merla et al observou a diminuição da expressão de genes adjacentes a uma região deletada (139), pronunciado em regiões

mais próximas aos pontos de quebra cromossômica, mas podendo ser observada em genes com até 5 Mb de distância.

Por fim, é importante ressaltar que a deleção da paciente HUB1 foi herdada da mãe que, apesar de apresentar DI moderada e algumas dismorfias leves, não apresenta MCs. Esse fato poderia enfraquecer a hipótese de que a região deletada é patogênica. No entanto, vários estudos observaram um grau elevado de expressividade variável em síndromes de microdeleção e microduplicação (92). Inclusive, na literatura há a descrição de casos de pacientes sem MCs ou sem DI (26,140), com quadros leves. Além disso, há a descrição de pacientes cuja deleção é herdada de um progenitor e, mesmo quando o progenitor é afetado, o quadro é consideravelmente mais leve que o do probando (38,125,141).

Ming et al. (2002) (142) sugerem a hipótese de uma herança digênica do tipo modificadora, em que um segundo gene mutado aumenta a severidade do quadro. Assim, CNVs ou mutações de ponto adicionais podem modificar o fenótipo ou agravá-lo, o que pode explicar síndromes com alta variabilidade clínica (107). Como a CMA detecta alterações razoavelmente grandes, é possível que alguma mutação menor afete um segundo gene e isso agrave o quadro do paciente, que já teria uma deleção herdada do progenitor.

Outra hipótese para a expressividade variável é a de heterozigiosidade composta. Estudos observaram que, além da deleção de um gene, é possível que haja uma mutação de ponto no gene no outro alelo, agravando ou modificando o quadro de um paciente (111,143). Essa possibilidade é descartada para os genes *DLL1* e *TBP*, tendo em vista que estudos em animais mostraram que mutações em homozigose eram letais (123,126). Porém, é possível que mutações de ponto nos outros genes da região deletada modifiquem o quadro do paciente e não foram detectadas pela CMA.

Assim, a observação de que a mãe da paciente, embora possua a mesma deleção, não apresenta MCs não invalida a hipótese de que a deleção é de fato patogênica. A expressividade variável é uma característica comum das síndromes de microdeleção e microduplicação. Além disso, é possível que as alterações na região 6q27 possuam penetrância incompleta, já considerada por outros autores (34,141).

Concluindo o caso da paciente HUB1, a síndrome de microdeleção 6q27 é uma síndrome complexa que apresenta expressividade variável e com possível penetrância incompleta e agravamento do quadro nas gerações seguintes. A deleção identificada na paciente pode ser considerada patogênica, sendo o gene *DLL1* o principal gene candidato na etiologia da MC observada na paciente.

4.2.2 Paciente HUB2

Paciente do sexo masculino, de 18 anos, filho de pais não consanguíneos, foi encaminhado pelo hebiatra para investigação de atraso do desenvolvimento e DI leve. TC de crânio aos 16 anos evidenciou afilamento difuso do corpo caloso, mesencéfalo e do restante do tronco cerebral, relação não harmônica entre os lobos frontais e o restante dos hemisférios cerebrais e assimetria craniofacial.

Nasceu a termo, de parto cesáreo. O paciente teve icterícia e fez fototerapia por 4 dias. Apresentou hérnia inguinal, com correção aos 4 anos. Apresentou atraso nos marcos do desenvolvimento: andou com 21 meses, falou as primeiras palavras aos 4 anos e controle vesical também aos 4 anos.

A mãe teve toxoplasmose no primeiro mês de gestação. A toxoplasmose pode ser transmitida durante a gestação, com taxa de 25% de transmissão quando contraída durante o primeiro trimestre, 54% durante o segundo e 65% durante o terceiro. As manifestações clínicas são mais severas em casos em que a infecção ocorre no primeiro trimestre. Entre as manifestações estão hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais e atraso do desenvolvimento. Entretanto, casos subclínicos foram descritos (144). Sendo assim, o paciente HUB2 foi incluído no projeto pois não havia dados suficientes sobre a gestação da mãe, da infecção e da transmissão para o paciente (como, por exemplo, valores de IgM e IgG da mãe e do paciente), além de existir a possibilidade de que o paciente, mesmo afetado, não apresentasse sinais ou sintomas.

Ao exame físico, apresentava sinofris, fendas palpebrais curtas e oblíquas pra cima, epicanto bilateral, raiz nasal média, dorso e base nasal largos com columela curta, lábios grossos com eversão do lábio inferior, orelhas grandes e displásicas, lóbulo proeminente, úvula curta proeminente. Aos 17 anos, não sabe ler ou escrever. Faz uso de medicação, Haldol e Depakene, para controle dos tiques da síndrome de Tourette.

O paciente possui cariótipo normal, além de resultado negativo para o exame de X-frágil. A CMA identificou uma deleção de 120 kbps no cromossomo 9: arr[hg19] 9q34.3(140,677,600-140,796,849) x1 (Figura 13).

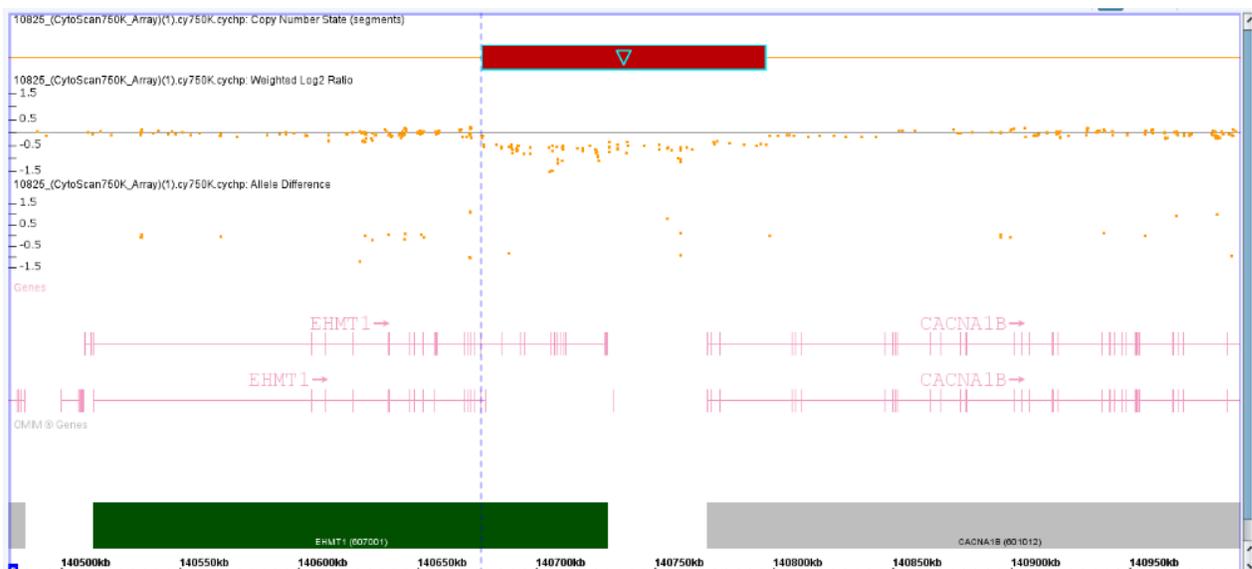


Figura 13. Resultado de exame de CMA do paciente HUB2, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 9 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 120 kbps.

Essa deleção envolve parcialmente dois genes descritos na base de dados OMIM, associados à síndrome de Kleefstra (gene *EHMT1* (#607001)) e à distonia autossômica dominante 23 (gene *CACNA1B* (#601012)).

Para determinar se esta deleção foi herdada de um dos pais, ou se tratava-se de uma alteração *de novo*, foi coletado sangue dos pais para realização de MLPA (Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação). O MLPA é um exame capaz de detectar diferentes tipos de alterações genéticas, como por exemplo CNVs e mutações de ponto, mas é um exame indicado quando há uma suspeita clínica, pois investiga apenas regiões específicas. A CMA é utilizada quando não há suspeita clínica e sua área de cobertura envolve todo o genoma. Assim, como uma alteração foi

identificada na CMA, não é necessário realizar a mesma técnica nos pais, podendo-se realizar um exame específico, com menor custo e com análise mais rápida, que avalie apenas a região alterada, apenas para confirmação do modo de herança da deleção.

A síndrome de Kleefstra é uma síndrome de microdeleção bem definida. Devido à alta variabilidade de expressão de síndromes de microdeleção e microduplicação, é comum realizar a CMA e identificar síndromes consideradas clinicamente reconhecíveis, que passaram despercebido pelo exame físico (92,96).

Os sinais mais comuns da síndrome são DI moderada a severa, hipotonia desde a infância, malformações cardíacas e dismorfias faciais (145–147). Pacientes com DI leve foram reportados na literatura (146,147), o que condiz com o quadro do paciente HUB2, que apresenta DI leve. A dificuldade na fala e na coordenação motora grossa apresentada pelo paciente também está descrita como parte da síndrome (145,146).

Entre as dismorfias faciais descritas na síndrome, o paciente HUB2 apresenta: sinofris, fendas palpebrais oblíquas pra cima e lábios grossos com eversão do lábio inferior (146,147).

A TC de crânio do paciente evidenciou afilamento difuso do corpo caloso, mesencéfalo e do restante do tronco cerebral, relação não harmônica entre os lobos frontais e o restante dos hemisférios cerebrais e assimetria craniofacial. Alterações do SNC foram descritas na síndrome de Kleefstra (146,147). Entre elas, hipoplasia de corpo caloso, redução volumétrica da substância branca e assimetria dos cornos anteriores foram observadas em pacientes descritos por Kleefstra e colaboradores (2009). Porém, pacientes sem alterações no SNC também já foram descritos na síndrome (146).

Distúrbios do comportamento e psiquiátricos fazem parte da síndrome, principalmente após a puberdade (146,147), o que também pode explicar o quadro de síndrome de Tourette apresentado pelo paciente HUB2.

A síndrome é herdada de forma autossômica dominante e a maior parte dos casos ocorre *de novo*. A deleção pode ser herdada, em casos no qual um progenitor possua uma translocação envolvendo a região 9q34, ou apresente mosaïcismo somático (147). A causa da síndrome de Kleefstra foi definida pela haploinsuficiência do gene *EHMT1*, que pode se dar por deleções ou mutações intragênicas (146). Esse gene é altamente

expresso no cérebro de camundongos, condizente com sua função no desenvolvimento do SNC (145).

O gene *EHMT1* codifica uma proteína capaz de modificar histonas através da transferência de um grupo metil e, conseqüentemente, está associado à diminuição da transcrição de um gene (148). Não existe uma relação genótipo-fenótipo para a síndrome de Kleefstra: pacientes com mutações intragênicas e deleções pequenas apresentam quadros clínicos similares. No entanto, pacientes com deleções maiores podem apresentar problemas adicionais, como infecções pulmonárias e dificuldade de aspiração (147).

A deleção do paciente HUB2 envolve também o gene *CACNA1B*, que foi associado à distonia autossômica dominante 23 (OMIM #601012). Esse gene codifica uma subunidade de um canal de cálcio dependente de voltagem que se localiza no neurônio pré-sináptico. Esse canal controla a entrada de cálcio no neurônio e a quantidade de neurotransmissores que será liberada na despolarização. Um estudo evidenciou uma mutação de ponto de sentido trocado no gene *CACNA1B*, gerando ganho de função, e sendo o responsável pelo quadro clínico de tremores em uma família com distonia-mioclonia (149).

As distonias são condições neurológicas que afetam a contração muscular e podem resultar em movimentos repetitivos ou posturas fixas. A distonia autossômica dominante 23 foi descrita em uma família com distonia cervical (150). Alguns membros da família apresentam leves tremores irregulares na cabeça, o que poderia ser confundido com a síndrome de Tourette apresentada pelo paciente HUB2 (149–151).

A deleção identificada no paciente HUB2 é considerada patogênica, sendo considerada causadora da síndrome de Kleefstra e das MCs observadas no paciente. A síndrome de Tourette identificada no paciente pode ser associada aos distúrbios do comportamento e distúrbios psiquiátricos da síndrome de Kleefstra, assim como a deleção do gene *CACNAB1*, que pode contribuir para o quadro de movimentos repetitivos, da distonia autossômica dominante 23.

4.2.3 Paciente SC1

Paciente do sexo feminino, de 18 anos, de pais não consanguíneos.

A TC de crânio identificou espaço liquórico ocupando quase toda a cavidade supratentorial, com pequenas áreas de preservações em regiões occipital-temporal, parietal e parasagital, compatíveis com holoprosencefalia alobar. Apresenta DI profunda, não desenvolvendo fala, controle vesical ou capacidade de sentar com apoio ou firmar a cabeça. Na família, há apenas relato de um tio materno com DI, mas não há relato de doença semelhante ou outras malformações.

Nasceu pré-termo, de seis meses, devido a um descolamento prematuro da placenta. A paciente ficou internada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) por três meses, teve insuficiência respiratória, icterícia e necessitou de antibióticos. A mãe, falecida, era portadora de AIDS. O vírus do HIV foi associado a danos no SNC, principalmente atrofia cerebral e redução volumétrica de várias estruturas cerebrais. Um estudo evidenciou que crianças infectadas no período perinatal apresentavam atrofia cerebral, calcificações nos núcleos da base e dilatação ventricular (152). Uma criança com holoprosencefalia alobar, filha de mãe portadora do vírus, foi descrita (153), mas a paciente SC1 foi incluída no projeto pois não havia dados suficientes sobre a gestação da mãe para afirmar que a causa do quadro foi a infecção viral. Não foi possível afirmar que houve transmissão vertical, que, em casos não tratados é em torno de 15-45% (154).

Ao exame físico, apresentava microcefalia, fronte proeminente, dentes tortos, palato ogival, retrognatia, cifoescoliose e atrofia muscular secundária à espasticidade.

Entre os antecedentes pessoais patológicos se encontram: déficit visual e nistagmo, paralisia cerebral tetraplégica espástica, epilepsia tônico-clônico generalizada (TCG) de difícil controle, disfagia neurogênica com necessidade de gastrostomia, doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), constipação crônica, pneumonia aspirativa de repetição, traqueostomia, pneumopatia restritiva secundária à deformidade de coluna e luxação de quadril esquerdo.

A CMA identificou uma deleção de 98 kbps no cromossomo 9: arr[hg19] 9p24.3(607,900-706,265) x1, que corresponde a deleção parcial do gene *KANK1* (Figura 14).



Figura 14. Resultado de exame de CMA da paciente SC1, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 9 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 98 kbps.

O gene *KANK1* regula a polimerização da actina e parece ser um gene supressor de tumor, pois sua expressão está diminuída em tecido de câncer renal (155). Um gene ortólogo em *C. elegans*, *vab-19*, é importante para a conexão do tecido muscular à epiderme e para a organização correta da actina (156). Indivíduos mutantes para *vab-19* apresentam descolamento do tecido muscular da epiderme e, em consequência dessa alteração muscular, são incapazes de rolar, apenas fazendo um movimento de contorsão.

O gene possui várias isoformas, com expressão tecido-dependente (155,157). Há duas variantes, A e B, sendo que a A, a mais curta, parece ser mais importante para o neurodesenvolvimento, devido ao menor número de CNVs encontradas nessa região, se comparado com a variante B (158).

Lerer e colaboradores descrevem uma família onde todos os afetados herdaram a deleção do genitor masculino enquanto que aqueles que herdaram a deleção de genitor feminino não são afetados, sugerindo, assim, uma possível regulação por *imprinting* (157).

Entretanto, há relatos de indivíduos que herdaram uma deleção de origem paterna e não apresentam o fenótipo, enfraquecendo tal hipótese (158,159).

Os pacientes descritos por Lerer se assemelham bastante ao paciente SC1, apresentando nistagmo, quadriplegia espástica, DI e malformação cerebral. Os pacientes do estudo apresentaram ventriculomegalia e atrofia cerebral (apesar de não ser considerada uma malformação cerebral), enquanto o paciente SC1 apresenta holoprosencefalia alobar. Apesar de terem sinais similares, a MC evidenciada no paciente SC1 é mais grave. Os outros antecedentes pessoais patológicos do paciente SC1 podem estar associados com essa MC mais severa.

Além da deleção do gene *KANK1*, outro fator que pode ter contribuído para o quadro do paciente é a hipóxia perinatal. Durante o desenvolvimento fetal e período perinatal, antes da mielinização, os precursores dos oligodendrócitos se proliferam, migram e amadurem (160). A ausência de oxigênio perinatal, pode acarretar em consequências para a formação da substância branca do SNC e, contribuir para a paralisia cerebral. Além disso, a presença de vários sítios de ligação de um fator de transcrição induzido por hipóxia, HIF1 (do inglês, hypoxia-inducible factor 1) *upstream* ao gene *KANK1* (161), sugere uma possível ação da hipóxia neste gene (157).

Outra hipótese levantada parte da observação feita por Lerer et al de que a expressão do gene *KANK1* em linhagens de células de linfoblastoides era monoalélica (157). Vanzo et al. (2013)(158) sugerem que a diferença entre os fenótipos se daria por expressão monoalélica estocástica. Esse tipo de expressão se caracteriza pela seleção da expressão de um dos dois alelos ainda na fase de desenvolvimento do indivíduo e pode ser uma forma de controle da dosagem genética (162,163). Esse fenômeno foi observado em células-tronco neurais (163) e em genes associados com doenças do neurodesenvolvimento, como esquizofrenia e autismo (162). Jeffries e colaboradores (2013)(162) sugerem que a expressão monoalélica estocástica pode ajudar a explicar doenças com penetrância incompleta e a diferença no quadro clínico de gêmeos monozigóticos discordantes.

Apesar das hipóteses expostas, é difícil explicar a MC tão acentuada do paciente SC1 através da CNV encontrada. É possível que haja uma combinação de fatores, em

que a hipóxia perinatal contribuiu para a gravidade do fenótipo, somado ao efeito da expressão monoalélica estocástica que acabou afetando mais células por motivos aleatórios. Em contraste, os pacientes descritos por Lerer teriam uma MC mais leve em razão da expressão monoalélica estocástica, que resultou em menos células afetadas. Além disso, outras hipóteses, como presença de mutações de ponto, não podem ser descartadas.

Sendo assim, a CNV pode ser considerada como potencialmente patogênica e é recomendada a realização de exoma ou de um sequenciamento especificamente da região deletada, na tentativa de se identificar outras mutações capazes de explicar a MC mais acentuada do paciente SC1.

4.2.4 Paciente SC2

Paciente do sexo masculino, de 14 anos, filho de pais não consanguíneos.

TC de crânio evidenciou paquigiria e agenesia do septo pelúcido.

O paciente nasceu a termo de parto normal. Era hipertônico e teve icterícia neonatal, permanecendo dois dias na maternidade, mas sem necessidade de fototerapia. A mãe teve infecção do trato urinário (ITU) na gravidez e um episódio de internação por febre e náuseas.

Ao exame físico, apresenta microcefalia, hipertelorismo, dentes tortos e baixo peso, apresenta DI severa, não desenvolvendo fala, controle vesical ou capacidade de sentar com apoio ou firmar a cabeça. O paciente frequenta escola de ensino especial.

Entre os antecedentes pessoais se encontram epilepsia TCG de difícil controle, paralisia cerebral tetraplégica espástica, disfagia neurogênica moderada, distúrbio do refluxo gastro-esofágico (DRGE) e criptorquidia.

A CMA identificou uma duplicação de 229 kbps no cromossomo 11: arr[hg19] 11q23.3(118,768,268-118,997,828) x3 (Figura 15), e outra duplicação de 192 kbps no cromossomo 3: arr[hg19] 3q29(197,451,713-197,643,460) x3.



Figura 15. Resultado de exame de CMA do paciente SC2, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região duplicada do cromossomo 11 (barra azul na parte superior) que possui aproximadamente 229 kbps.

4.2.4.1 Duplicação 11q23

Não há artigos relacionando duplicações na região 11q23 e um quadro clínico específico, mas há mais pacientes registrados na base de dados DECIPHER do que na base de dados DGV, indicando que CNVs no local podem afetar genes sensíveis a dosagem e causar alterações fenotípicas. Alguns pacientes descritos no DECIPHER apresentam MCs: o paciente #767 apresenta hidrocefalia e hipoplasia do corpo caloso; o paciente #322744 apresenta agenesia de corpo caloso, heteropia e arrinencefalia e o paciente #266266 apresenta hipoplasia do verme cerebelar. Entretanto, todos possuem duplicações bastante extensas, de pelo menos 18 Mb.

A região deletada no paciente SC2 envolve 13 genes descritos na base de dados OMIM: *BCL9L*, *UPK2*, *FOXR1*, *RPS25*, *TRAPPC4*, *SLC37A4*, *HYOU1*, *VPS11*, *HMBS*, *H2AX*, *DPAGT1*, *C2CD2L* e *MZIF*, sendo quatro deles associados anteriormente a doenças. O gene *HMBS* foi associado a porfiria intermitente aguda, de herança dominante (164), e é expresso em fígado e eritrócitos (165). O gene *SLC37A4* foi

associado a dois tipos de doença de depósito de glicogênio, ambos herdados de forma recessiva (166). O gene *DPAGT1* foi associado ao distúrbio de glicosilação tipo I e à síndrome miastênica congênita tipo 13, ambas herdadas de forma recessiva (167).

O gene *VPS11* foi associado à leucodistrofia hipomielinizante tipo 12, cujos sinais podem incluir afilamento do corpo caloso, atraso do desenvolvimento, DI, ausência de fala, alterações na substância branca, entre outros (168). A leucodistrofia hipomielinizante tipo 12 é uma doença é herdada de forma recessiva e, para que o paciente SC2 recebesse o diagnóstico da doença, este deveria necessariamente apresentar outra mutação no segundo alelo do gene *VPS11*. Entretanto, não houve suspeita dessa doença durante a investigação do paciente.

Com base nessas informações, a CNV pode ser interpretada como potencialmente patogênica. Apesar de não haver ainda um gene descrito na região que seja capaz de explicar o quadro de MCs observado no paciente SC2, a maior prevalência da duplicação em pacientes afetados levanta a possibilidade de existirem na região genes sensíveis à dosagem. Quatro genes da região já foram descritos na base de dados OMIM, tendo sido associados a doenças. Entretanto, a haploinsuficiência destes quatro genes não explica o fenótipo clínico observado no paciente. Dentre os outros nove genes restantes, *UPK2*, *FOXR1*, *RPS25*, *TRAPPC4*, *HYOU1*, *VPS11*, *H2AX*, *C2CD2L* e *MZIF*, é possível que haja um ou mais genes com função importante para o desenvolvimento do SNC e que futuramente possa explicar a MC. Por exemplo, o gene *FOXR1*, da família FOX (forkhead-box) se encontra na região, mas pouco se sabe a respeito de sua expressão e função.

4.2.4.2 Duplicação 3q29

A síndrome de microduplicação 3q29 já foi descrita por outros autores como uma síndrome com fenótipo clínico e neuropsicológico heterogêneos (169,170). Os sinais

mais comuns são DI, dismorfias faciais leves e distúrbios do comportamento e o fenótipo é considerado mais leve que a síndrome de microdeleção recíproca (169–171).

A síndrome de microduplicação 3q29 possui pontos de quebra específicos, flanqueados por LCRs (do inglês, Low Copy Repeats), gerando uma duplicação de cerca de 1,6 Mb (169,171). A CNV detectada no paciente SC2 é menor e se localiza mais terminalmente que a duplicação típica. Um estudo por Tassano e colaboradores (2018)(169) descreve um paciente com uma duplicação pequena, de 447 kbps, e tenta estabelecer uma região crítica. A região estabelecida por eles envolve dois genes *DLG1* e *BDH1*. Os autores sugerem que o ganho de dosagem destes genes é o responsável pelo fenótipo da síndrome de microduplicação 3q29. A deleção do paciente SC2 se encontra fora da região típica da síndrome e estes dois genes estão localizados proximalmente à duplicação. Porém, eles estão localizados próximos o bastante para sofrerem efeito de posição (139).

A duplicação envolve apenas três genes: *RUBCN*, *FYTTD1* e *IQCG*. Há um número maior de pacientes descritos no DECIPHER, indicando uma maior probabilidade de ser uma CNV patogênica. O paciente SC2 apresenta atraso nos marcos do desenvolvimento, microcefalia, DRGE e epilepsia, também registrado em outros pacientes no DECIPHER.

MCs são incomuns na síndrome mas já foram descritas em outros pacientes, como heterotopia periventricular; hipoplasia do verme cerebelar (169); mielomeningocele, malformação de Chiari tipo II e ausência de septo pelúcido (170) e variante de Dandy-Walker (172). A paciente # 253721 do DECIPHER apresenta hipoplasia do corpo caloso, mas sua duplicação contém 15 Mb, e além da duplicação, a paciente apresenta outras duas deleções, o que dificulta a interpretação da duplicação 3q29 em si.

A paciente 3 descrita por Goobie et al (2009)(172) apresenta DI profunda, não exibindo controle vesical aos 16 anos e com uma duplicação de 1,9 Mb na região 3q29, indicando que a CNV detectada no paciente SC2 possa ser causadora do quadro de DI severa. Outra paciente, descrita por Fernández-Jaén et al. (2014)(171), apresenta paralisia cerebral e também não desenvolveu marcha nem controle vesical.

As malformações descritas nos pacientes são distintas, mas a paciente descrita por Lawrence et al (2017)(170) também apresenta agenesia de septo pelúcido. A paciente tem uma duplicação de quase 3 Mb, envolvendo 25 genes, incluindo os três genes duplicados no paciente SC2. O paciente SC2 apresenta agenesia de septo pelúcido e paquigiria. A agenesia de septo pelúcido é um sinal em comum com a paciente descrita Lawrence et al (2017)(170) e a paquigiria pode ser uma outra apresentação das MCs observadas nessa síndrome.

Entre os três genes encontrados na região, *RUBCN*, *FYTTD1* e *IQCG*, apenas o *RUBCN* (OMIM #613516) foi associado a uma doença, a ataxia espinocerebelar autossômica recessiva tipo 15. Os sinais dessa doença incluem atraso do desenvolvimento, epilepsia, DI e disartria (173), que são sinais apresentados pelo paciente. Entretanto, ele não apresenta outros sinais clínicos que justificariam o diagnóstico dessa doença e o paciente apresenta duplicação desse gene, o que contraria a herança autossômica recessiva.

Expressão do *RUBCN* foi detectada em vários tecidos em camundongo, com sinal mais intenso no SNC (174). A proteína regula negativamente a autofagia e o trânsito intracelular (175).

O gene *FYTTD1* codifica uma proteína responsável por transportar o mRNA para o núcleo celular e é expresso em vários tipos celulares em embrião de galinha (176).

O gene *IQCG* é mais intensamente expresso em estômago e testículo. Sua função é desconhecida, mas um estudo indica que a proteína pode ter função hematopoiética (177).

Em conclusão, a CNV pode ser considerada potencialmente patogênica. Ainda não é possível realizar uma relação genótipo-fenótipo precisa nem estabelecer qual ou quais genes são mais importantes para as alterações do SNC, mas há evidências na literatura de que a CNV pode causar erros na formação do SNC e MCs variadas, apesar de o mecanismo ser desconhecido.

4.2.5 Paciente SC3

Paciente do sexo feminino, de 26 anos, não possui dados dos antecedentes familiares, então não é possível descartar consanguinidade.

TC de crânio aos 13 anos evidenciou acentuada dilatação do sistema ventricular, apagamento de sulcos e fissuras corticais e espessamento difuso da calota craniana. Aos 24 anos, TC de crânio evidenciou acentuada hidrocefalia supratentorial, imagens hipoatenuantes localizadas nos lobos frontais, sugerindo áreas de encefalomalácia e pansinusopatia inflamatória.

Nasceu a termo, de parto domiciliar, não chorou e ficou cianótica, mas não apresenta problemas cardíacos. A mãe teve pré-eclâmpsia e acidente de choque elétrico aos 6 meses de gravidez, além de sofrer violência física do pai durante a gravidez. A mãe apresentava transtorno bipolar severo, com numerosas internações, e faleceu por cardiopatia. Não há informações sobre a mãe com relação a medicações durante a gestação.

Ao nascimento, apresentou espinha bífida lombar e hidrocefalia congênita. Foi operada para correção de mielomeningocele e colocação de DVP (derivação ventrículo-peritoneal). Com um ano realizou vesicostomia devido a múltiplas infecções urinárias. Mãe refere convulsão no primeiro ano de vida e uso de gardenal.

Entre os antecedentes pessoais se encontram encefalopatia crônica não evolutiva síndrômica, pé torto congênito bilateral, hidrocefalia congênita corrigida com DVP e mielomeningocele corrigida, bexiga neurogênica, DI moderada, paralisia cerebral diplérgica espástica de membro superior, paraplegia flácida simétrica, nistagmo, epilepsia de difícil controle, asma persistente moderada, distúrbio da linguagem oral, disfagia orofaríngea neurológica leve além de sofrer maus tratos na infância.

Ao exame físico, apresentava microcefalia, obesidade, baixa estatura, palato ogival, atrofia e hipotonia de membros inferiores. Não desenvolveu fala, controle vesical ou capacidade de sentar sem apoio ou andar, mas apresenta controle de tronco, sorriso social, firma o pescoço e senta com apoio.

A CMA identificou uma deleção de 2,7 Mb no cromossomo 1: arr[hg19] 1q21.1q21.2(145,764,678-148,520,164) x1 (Figura 16).

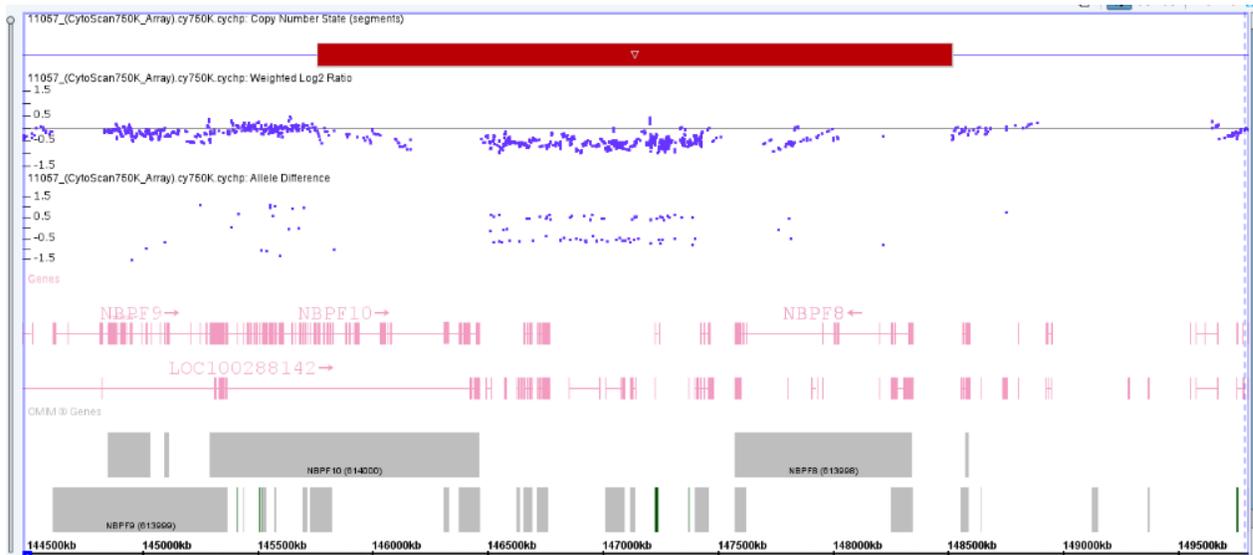


Figura 16. Resultado de exame de CMA da paciente SC3, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 1 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 2,7 Mb.

A CMA identificou uma deleção de 2,7 Mb na região 1q21, que já foi descrita como uma síndrome de microdeleção. Assim como outras síndromes de microdeleção e microduplicação, possui alta variabilidade de expressão, o que dificulta o reconhecimento clínico da síndrome (92,178,179). A síndrome de microdeleção 1q21 não possui um fenótipo reconhecível (178,179).

Os pontos de quebra nessa síndrome podem ser recorrentes, gerando uma deleção de 1,3 Mb e os sinais mais comuns na síndrome 1q21 recorrente são microcefalia, DI leve, dismorfias faciais leves e anormalidades oculares (179,180). O fenótipo pode variar no caso de pontos de quebra não recorrentes, dependendo dos outros genes afetados (92,180). Pode ser *de novo* ou herdada de um progenitor com fenótipo normal ou mais leve que o do probando (178–180).

Entre os sinais descritos na síndrome, a paciente apresenta DI moderada, distúrbio da linguagem oral, epilepsia, microcefalia, baixa estatura, nistagmo e hipotonia de membros inferiores. Refluxo vesicoureteral também foi descrito em pacientes com

essa síndrome (DECIPHER #331384, #280387), explicando o quadro de ITUs de repetição na paciente. As ITUs e a hipotonia dos membros inferiores também podem ser consequência da correção da mielomeningocele. A paciente não desenvolveu fala, o que difere dos pacientes descritos com a síndrome com pontos de quebra recorrente. Os pacientes apresentam atraso de desenvolvimento da fala leve a moderado, principalmente durante a infância, mas apresentam melhoras posteriormente, podendo atingir valores de QI verbal próximos aos da média populacional (180,181). A deleção na paciente é maior que a deleção típica, envolvendo 2,7 Mb em vez de 1,3 Mb, o que condiz com um quadro mais variável e mais grave.

A primeira TC de crânio da paciente evidenciou acentuada dilatação do sistema ventricular, apagamento de sulcos e fissuras corticais e espessamento difuso da calota craniana. A segunda TC evidenciou acentuada hidrocefalia e áreas de encefalomalácia e pansinusopatia inflamatória. É interessante ressaltar que a paciente apresenta microcefalia, apesar da hidrocefalia, que geralmente se apresenta da forma oposta, com macrocefalia (182).

A presença de MCs foram descritas na síndrome, apesar de serem incomuns, afetando menos de 10% dos pacientes (178–180). As MCs mais comuns são hidrocefalia e agenesia do corpo caloso (180), explicando assim a hidrocefalia observada na paciente. O apagamento de sulcos e fissuras corticais pode ser resultado da hidrocefalia congênita (183). Um estudo observou diminuição do volume do corpo caloso em pacientes com duplicação da região 1q21, indicando a possibilidade de haver um gene sensível à dosagem associado com a formação do corpo caloso nessa região (181).

Estudos que avaliaram o perímetro cefálico de pacientes com microduplicação e microdeleção da região 1q21 evidenciaram que os pacientes apresentavam macrocefalia e microcefalia, respectivamente (178,179,181). Um estudo sugere que um gene parálogo do *HYDIN* se encontra nessa região e é responsável pelas anormalidades no perímetro cefálico (178,184). Estudos evolutivos sugerem que o gene *HYDIN*, que se encontra no cromossomo 16, sofreu uma duplicação e inserção no cromossomo 1, formando o gene parálogo, *HYDIN2* (178,179,184). Além disso, mutações em homozigose no gene *HYDIN* em camundongos causam hidrocefalia, fazendo com que o parálogo, *HYDIN2*, seja um

candidato para a hidrocefalia apresentada na paciente SC3 (178). O *HYDIN2* é altamente expresso no cérebro, de acordo com um estudo realizado com camundongos (178,185).

Há dois genes na região, descritos na base de dados OMIM, que já foram associados a doenças: *GJA5* (OMIM # 121013), associado à fibrilação atrial, e *GJA8* (OMIM #600897), associado a catarata. No entanto, a paciente não apresenta nenhum desses sinais. A deleção envolve outros 14 genes descritos na base OMIM. Harvard e colaboradores (2011)(186) sugerem os genes *CHDL1* e *PRKAB2* como candidatos para o quadro clínico da síndrome. Ambos são sensíveis à dosagem e o *CHDL1* foi associado à instabilidade genômica, enquanto o *PRKAB2* codifica uma subunidade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Um estudo com camundongos nocaute para outra subunidade da AMPK, a subunidade B1, evidenciou diminuição da atividade da AMPK e anormalidades do SNC, fazendo com que o *PRKAB2*, em particular, seja um bom candidato para as MCs (186,187).

O fato de que portadores de CNVs na região 1q21 são assintomáticos pode servir de argumento para que a interpretação da CNV de uma variante benigna. Entretanto, CNVs nessa região são raras na população normal, com frequência aproximada de 0,02%. Assim, pode-se considerar que a CNV é patogênica, e que a síndrome de microdeleção 1q21 apresenta expressividade variável e penetrância incompleta (178,179).

Concluindo, a deleção encontrada na paciente SC3 pode ser considerada patogênica e explica o quadro de MCs apresentado pela paciente. Ademais, considerando que pode ser herdada de um dos progenitores, é aconselhado que os pais realizem exame genético, como, por exemplo, o MLPA, para avaliarem se são portadores ou se a deleção foi *de novo*.

4.3 PACIENTES COM ALTERAÇÕES CONSIDERADAS VOUS

4.3.1 Paciente HUB3

Paciente do sexo masculino, de 10 anos, filho de pais não consaguíneos, foi encaminhado pelo neurologista para investigação de déficit cognitivo.

TC de crânio aos 5 anos evidenciou variante de Dandy-Walker, com hipoplasia de parte do verme cerebelar, comunicando espaço cístico em fenda, comunicando a porção posterior do 4^o ventrículo com cisterna magna alargada.

Nasceu a termo, de parto cesáreo devido a sofrimento fetal agudo, apresentando desconforto respiratório e icterícia. A mãe teve bolsa rota por 7 dias e fez uso de antibiótico por 9 dias. O paciente fez fototerapia por 4 dias e permaneceu na maternidade por 9 dias, enquanto a mãe fazia uso de antibiótico. A mãe refere que fez uso de tabaco durante a gestação, fumando um cigarro por dia. Apesar da exposição ao tabaco, o paciente foi incluído no projeto pois não há uma relação bem estabelecida entre exposição pré-natal e malformações cerebrais, bem como concentrações consideradas definitivamente danosas.

Apresentou atraso nos marcos do desenvolvimento: sustentou a cabeça com 8 meses, sentou com 9 meses, ficou em pé com 18 meses, andou aos 24 meses, falou as primeiras palavras com um ano e as primeiras frases aos 7 anos. Apresentou controle vesical e anal aos 12 meses.

Ao exame físico, apresentava fendas palpebrais oblíquas pra cima, raiz nasal baixa, ponta nasal larga e baixa, alteração em implantação dentária, incisivos centrais superiores longos e largos, encurtamento do quinto dígito, alargamento de háluces e implantação proximal de quintos pododáctilos.

O paciente possui cariótipo normal, com aumento de tamanho do cromossomo Y devido a excesso de heterocromatina, que é considerado um polimorfismo. Assim, o resultado do cariótipo foi determinado como 46, XYqh+ e não tem relação com a história

clínica do paciente. Possui resultado negativo para o exame de X-frágil. A CMA identificou uma deleção de 653 kbps no cromossomo 22: arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,997,928-23,650,871) x1 (Figura 17).

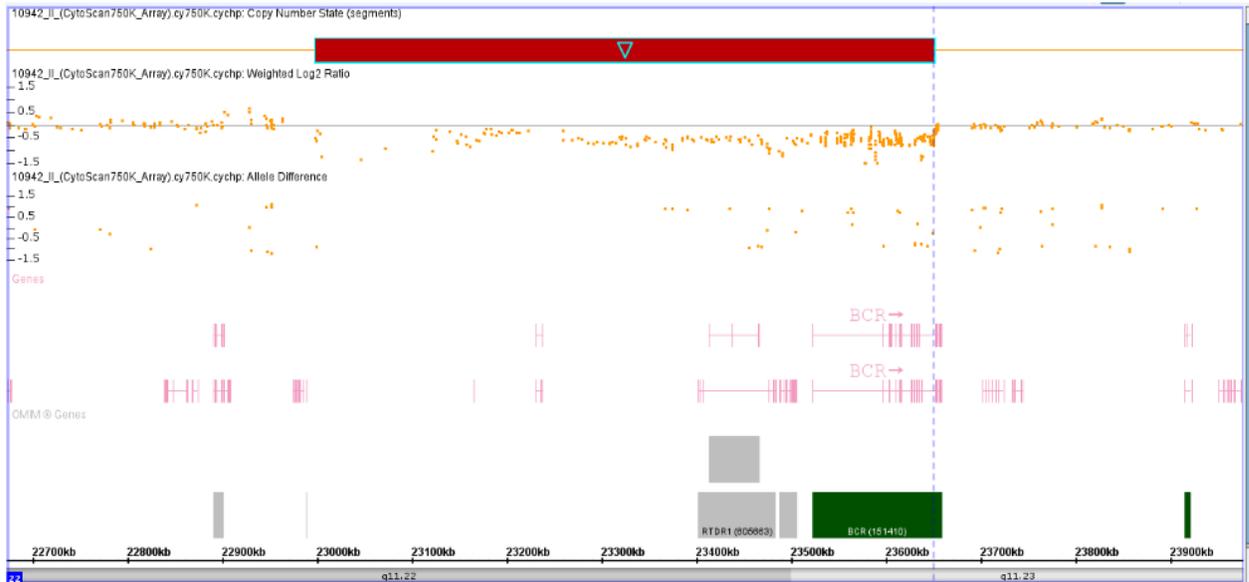


Figura 17. Resultado de exame de CMA do paciente HUB3, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 22 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 653 kbps.

A CMA identificou uma deleção de 653 kbps no cromossomo 22, abarcando as regiões 22q11.22 e 22q11.23. Tanto deleções quanto duplicações foram encontradas nessa região e foram associadas a síndromes bem descritas, como a síndrome de DiGeorge, velocardiofacial e a síndrome do olho de gato (92). Entretanto, certas síndromes que às vezes são consideradas como condições diferentes, como a síndrome de DiGeorge e a síndrome velocardiofacial, apresentam expressividade variável e sintomas que se sobrepõem e há autores que defendem que essas condições são diferentes apresentações de uma mesma síndrome, que deveria ser chamada apenas de deleção 22.q11 (188).

A região 22q11 possui quatro blocos de LCRs, gerando uma predisposição a erros de alinhamento e, conseqüentemente, duplicações e deleções. Essas repetições fazem

com que a região 22q11 seja inerentemente instável e explicam a alta frequência de CNVs encontradas em pacientes e a expressividade variável da síndrome (188).

Há um grande número de registros de CNVs no DGV de tamanhos altamente variáveis. Há também uma deleção de tamanho muito próximo à do paciente HUB3 (nsv521695)(189). Porém, há uma quantidade ainda maior de registros no DECIPHER, indicando que CNVs nessa região são mais frequentes em pacientes afetados do que na população normal. Há 13 pacientes com deleções com pontos de quebra próximos aos detectados no paciente HUB3 (317984, 279396, 271344, 274547, 276241, 253462, 265081, 287215, 300532, 332001, 279306, 324287, 362600).

Comparando apenas com esses pacientes com deleções similares, existem pacientes que apresentam atraso do desenvolvimento ou DI, em comum com o paciente HUB3, mas não há relatos de MCs. Apenas o paciente 265081 apresenta hidrocefalia. Essas deleções similares foram classificadas como VOUS.

Comparando com as deleções maiores depositadas no DECIPHER, há relatos de pacientes com microcefalia, mas nenhum que apresentasse variante de Dandy-Walker, vista no paciente HUB3, diminuindo a probabilidade de a CNV ser patogênica nesse caso.

A deleção inclui quatro genes descritos na base de dados OMIM: *RSPH14*, *GNAZ*, *RAB36* e, parcialmente, o *BCR*. O gene *BCR* é o único gene, descritos na base OMIM, na região que já foi associado a doenças: leucemia mieloide crônica e leucemia linfocítica aguda.

Zhou e colaboradores (2000)(190) realizaram um estudo na região 22q11, avaliando, em especial, os genes *RSPH14*, *GNAZ*, *RAB36*. Expressão do gene *RSPH14* foi detectada através de Northern Blot no cérebro, pulmão, fígado e rim fetais, com sinal mais intenso no rim. RT-PCR também detectou expressão no cerebelo, medula espinhal, baço e músculo esquelético em tecidos normais e em amostras de tumor rabdoide, que não apresentavam mutações nesse gene. A função desse gene é desconhecida.

O *GNAZ* codifica uma subunidade da proteína G, que participa da transdução de sinal, alterando os níveis de mensageiros secundários dentro da célula (191). Altos níveis de mRNA foram detectados no cérebro e na retina (192).

O *RAB36* é expresso em cérebro, pulmão, fígado e rim fetais e ubiqüamente em tecidos adultos. Sua função ainda não foi definida, mas a proteína é homóloga a vários membros da família Rab, que funcionam como reguladores do transporte vesicular intracelular e se encontram no corpúsculo de Golgi (190,193).

Por fim, o gene *BCR* foi associado à leucemia mieloide crônica, à leucemia linfocítica aguda e é conhecido pela formação de uma proteína quimérica, resultado de sua junção ao gene *ABL*, formando o cromossomo Filadélfia. O *BCR* é expresso ubiqüamente nos tecidos, apresentando alta expressão no cérebro e em células hematopoiéticas, com base em estudos em embriões de galinha, camundongo e humanos. É expresso nos estágios iniciais da diferenciação mieloide, com progressiva diminuição da expressão à medida que os leucócitos amadurecem (194).

A proteína BCR é capaz de autofosforilar resíduos de serina e treonina. O primeiro éxon do *BCR* está presente em todas as proteínas quimeras do BCR-ABL, indicando a importância crítica deste éxon na função da proteína (194).

Concluindo o caso do paciente HUB3, a região 22q11 é inerentemente instável e CNVs de tamanhos variados são comuns, com pacientes afetados e não afetados apresentando alterações nessa região. O número de pacientes afetados é maior que o de não afetados, indicando uma possibilidade de a deleção ser patogênica, mas por enquanto não há evidências suficientes para classificar a CNV como tal. Sendo assim, a CNV é interpretada como VOUS. Os quatro genes localizados na porção deletada, *RSPH14*, *GNAZ*, *RAB36* e *BCR*, apresentam expressão no cérebro e a função de alguns destes genes ainda é desconhecida. A interpretação da CNV pode mudar à medida que mais estudos forem realizados nesses genes e mais pacientes forem registrados nos bancos de dados, permitindo uma melhor relação genótipo-fenótipo.

4.3.2 Paciente SC4

Paciente do sexo feminino, de 14 anos, filha de pais não consanguíneos.,

TC de crânio aos 13 anos evidenciou hidrocefalia supratentorial, com sinais de hipertensão associada e agenesia de septo pelúcido.

A paciente nasceu pós-termo, de parto cesariano. Mãe refere que fumou e bebeu na gravidez, além de sofrer violência física, com traumas frequentes no abdome durante a gravidez.

Apresentou numerosas complicações após correção de mielomeningocele toracolombar e que levou a 2 internações longas durante os 6 primeiros meses de vida. Durante a segunda internação apresentou quadro de meningite, pneumonia e asma. Aos 2 meses de vida apresentou episódio de crise convulsiva.

Firmou a cabeça com 3-4 meses, apresentou sorriso social aos 3 meses, sentou com apoio aos 8 meses, sem apoio aos 4 anos, mas não desenvolveu fala, controle vesical ou capacidade de andar.

Entre os antecedentes pessoais se encontram encefalopatia crônica não evolutiva sindrômica, mielomeningocele corrigida, DI grave, paraplegia flácida simétrica, surdez, epilepsia TCG, distúrbio da linguagem oral, DRGE, malformação renal, ITU de repetição secundário a bexiga neurogênica, insuficiência renal crônica compensada, deformidade de coluna torácica, fusão de costelas e maus tratos na infância.

Ao exame físico, apresentava microcefalia, baixo peso, baixa estatura, pectus excavatum, tornozelo valgo acentuado bilateral e postura viciosa de articulações de joelhos e quadril.

A CMA identificou uma deleção de 1,5 Mb no cromossomo 2: arr[hg19] 2q12.2q12.3(106,884,820-108,440,138) x1 (Figura 18).

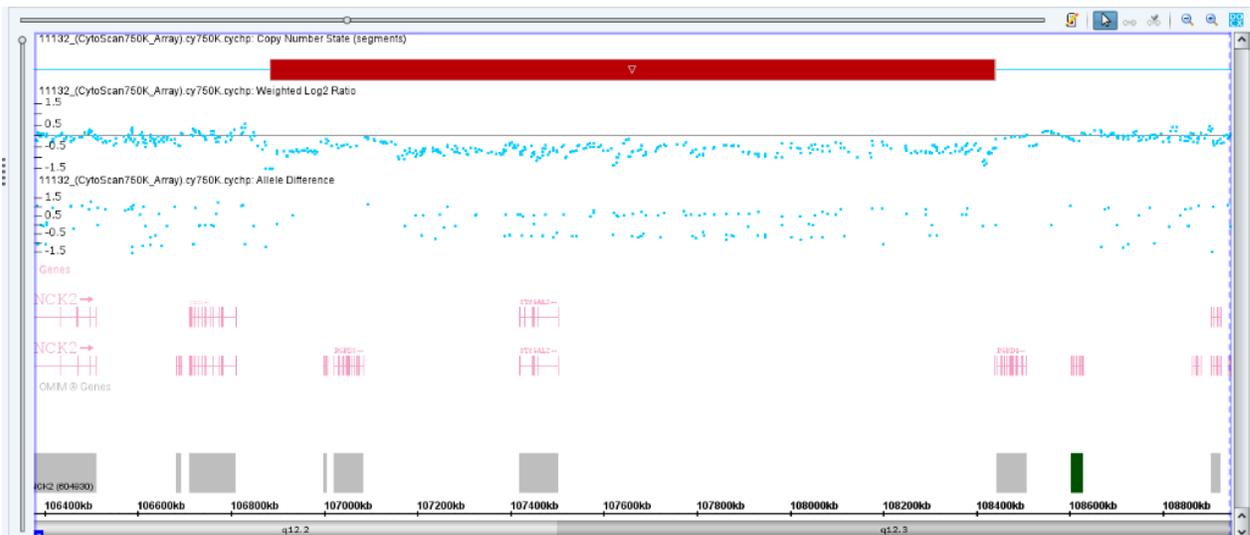


Figura 18. Resultado de exame de CMA da paciente SC4, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região deletada do cromossomo 2 (barra vermelha na parte superior) que possui aproximadamente 1,5 Mb.

A CMA identificou uma deleção de 1,5 Mb na região 2q12, envolvendo três genes descritos na base de dados OMIM: *PLGLA*, *RGPLD3* e *ST6GAL2*. Nenhum dos três genes foi associado a doenças e poucos estudos investigando tais genes foram realizados. O gene *PLGLA* tem expressão restrita ao fígado (195), diminuindo a possibilidade de contribuição para o quadro clínico da paciente.

O gene *ST6GAL2* é expresso no cérebro (196), com um transcrito detectado exclusivamente nesse órgão (197). Codifica uma enzima capaz de transferir uma molécula de ácido siálico a oligosacarídeos com uma sequência específica. Sialiloligosacarídeos são considerados importantes para o crescimento e desenvolvimento durante a infância (196). Assim, é possível que o *ST6GAL2* contribua para o desenvolvimento do SNC no cérebro fetal.

O gene *RGPLD3* surgiu de duplicações em um gene próximo, *RANBP2*, com o qual possui alta homologia. Entretanto, não é possível fazer inferências sobre a função do *RGPLD3*, que pode ter se modificado no processo de duplicação e com a mudança da sequência não-homóloga na região C-terminal (198).

O gene *RANBP2* encontra-se próximo da região deletada na paciente, a menos de 300 kbs. Assim, é possível que ele seja afetado pelo efeito de posição (139). Ele foi

associado a uma susceptibilidade à encefalopatia necrotizante aguda (199) e, portanto, não parece ter contribuído para o quadro clínico da paciente. Porém, considerando sua função relacionada ao SNC, é possível que o gene *RGPD3* também tenha uma função importante para o SNC, sendo um candidato interessante para futuros estudos.

O gene *SLC5A7*, que também se encontra numa região passível de sofrer efeito de posição (139), já foi associado a uma doença de herança autossômica dominante, a neuropatia motora hereditária distal tipo 7A (MIM #158580). O fenótipo inclui dificuldade de caminhar, fraqueza e atrofia de membros causadas por neuropatia periférica e paresia das cordas vocais (200–202). Assim, é possível que a dificuldade de caminhar e de controle vesical exibidas pela paciente tenham contribuição genética da diminuição da expressão desse gene, e não apenas como resultado da mielomeningocele corrigida. Entretanto, a condição é progressiva e geralmente se apresenta na segunda década de vida e não há registro de microdeleções envolvendo esse gene nos pacientes descritos com esse tipo de neuropatia. As mutações encontradas nesse gene envolvem principalmente mutações de sentido trocado ou mutações por mudança de matriz de leitura (200–202).

Há uma quantidade similar de pacientes descritos no DGV e no DECIPHER com CNVs nessa região, o que dificulta a interpretação dessa CNV como benigna ou patogênica. Há pacientes registrados no DECIPHER com sinais apresentados pela paciente, entre eles: distúrbio da linguagem oral, DI, epilepsia, baixa estatura e microcefalia. No entanto, também há pacientes com alta estatura ou macrocefalia.

A paciente SC4 apresenta vários outros sintomas que não foram descritos nos pacientes registrados no DECIPHER, como, por exemplo, hidrocefalia, agenesia de septo pelúcido, malformação renal e mielomeningocele. Além disso, não há artigos relacionando a deleção da região 2q12 com malformações cerebrais, dificultando a interpretação da CNV como patogênica.

Portanto, conclui-se que, a CNV encontrada não é o suficiente para se explicar o quadro clínico da paciente, em especial o fenótipo das MCs. Os genes *RGPD3* e *ST6GAL2* são candidatos como possíveis contribuidores para o desenvolvimento do SNC, mas carecem de mais estudos. Sendo assim, a CNV encontrada na paciente SC4 é interpretada como VOUS.

4.3.3 Paciente SC5

Paciente do sexo feminino, de 24 anos, sem dados paternos e, portanto, não sendo possível descartar consanguinidade.

TC de crânio aos 23 anos evidenciou desproporção craniofacial, com sinal de redução volumétrica encefálica de forma exacerbada para a faixa etária.

Nasceu a termo. Mãe refere uso de tabaco na gravidez.

Ao exame físico, apresentava baixo peso, baixa estatura, palato ogival, postura viciosa das articulações de membros inferiores e superiores, com atrofia dos mesmos. Apresentava cavalgamento de 2º e 3º pododáctilos e tornozelo valgo acentuado.

A paciente não desenvolveu fala, sorriso social, controle vesical ou capacidade de sentar sem apoio

Entre os antecedentes pessoais se encontram encefalopatia crônica não evolutiva sindrômica, DI profunda, surdez, deficiência visual, distúrbio da linguagem oral, DRGE, disfagia orofaríngea neurogênica moderada, cifoescoliose severa dextroconvexa, paralisia cerebral tetraplégica espástica e epilepsia TCG.

Entre os antecedentes familiares maternos, a mãe apresenta surdez e refere que várias pessoas na família apresentam DI.

A CMA identificou duas duplicações próximas uma da outra, no cromossomo 12: arr[hg19] 12p13.33(1,317,638-1,627,395) x3 e arr[hg19] 12p13.33(1,190,349-1,291,079) x3 (Figura 19). Entre as duplicações há uma pequena região deletada, caracterizando essa alteração como um rearranjo complexo. Além disso, foi evidenciada consanguinidade, com base em uma avaliação de regiões de perda de heterozigose feita pelo software ChAS. As duas duplicações juntas envolvem cerca de 470 kbps e apenas o gene *ERC1*, que se encontra descrito na base de dados OMIM.

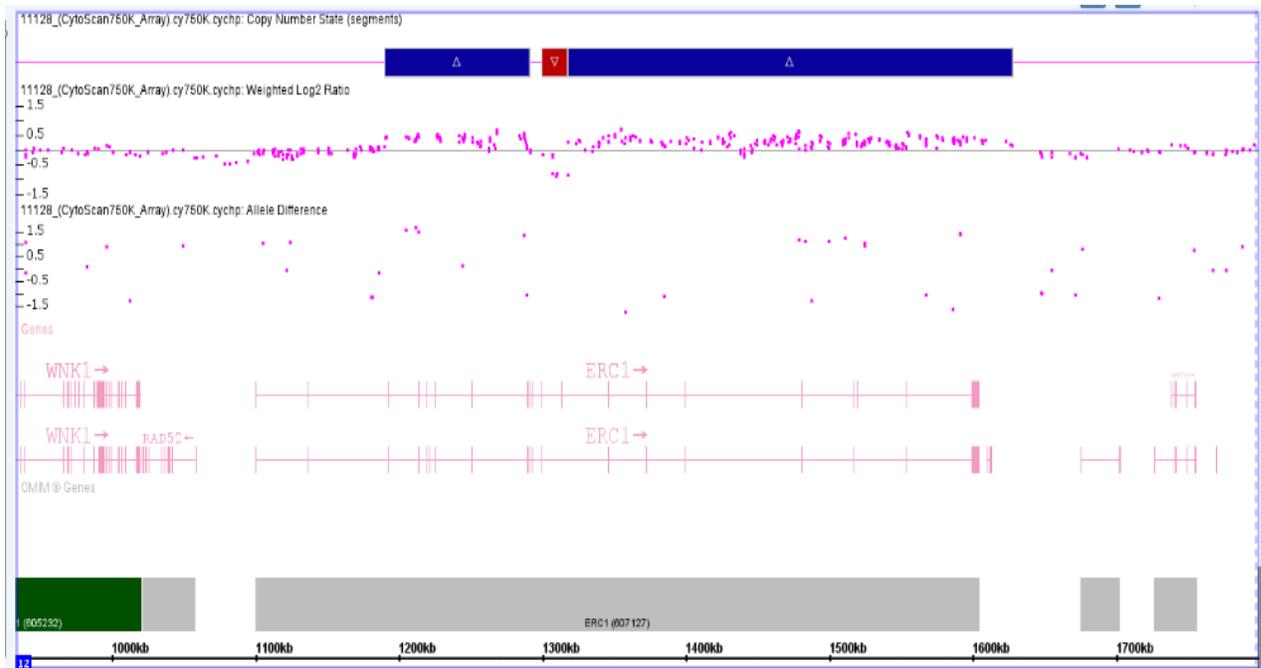


Figura 19. Resultado de exame de CMA da paciente SC5, visualizado por meio do software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), no qual pode-se observar a região duplicada do cromossomo 12 (barras azuis na parte superior) que possui aproximadamente 470 kbps, com uma pequena região deletada entre elas (barra vermelha)

Em humanos, o gene *ERC1* é expresso no cérebro, mas sua expressão é mais elevada no coração, tireoide, músculo esquelético, córtex adrenal, testículo e placenta (203). O gene codifica uma proteína que compõe o complexo IKK, que regula a expressão de genes mediado pelo fator nuclear kappa-B (204).

Análise dessa região em bancos de dados evidencia que a porção duplicada é mais prevalente na população de pessoas afetadas do que de pessoas normais. Porém, as informações disponíveis sobre o gene *ERC1* não são suficientes para explicá-lo como causador do quadro clínico da paciente. Sendo assim, a CNV pode ser interpretada como VOUS.

Com relação à consanguinidade, sabe-se que blocos de homozigose podem ser sugestivos de doenças com herança recessiva (205). Prasad e colaboradores (2018)(205) realizaram um estudo utilizando sequenciamento de exoma completo em pacientes cuja CMA revelou blocos de homozigose e identificaram alterações patogênicas ou possivelmente patogênicas em 11% dos casos.

5. CONCLUSÃO

A taxa de diagnóstico geral da CMA foi de 23,8% e a taxa de VOUS, de 14,3%. No grupo 1, a taxa de diagnóstico de CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas foi de 18%, enquanto no grupo 2 foi de 30%. A taxa de VOUS detectadas no grupo 1 foi de 9%, e no grupo 2, de 20%. Assim, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a CMA é um método eficiente para investigar a etiologia genética de malformações do SNC.

As CNVs del6q27, del9q34 e del1q21 foram consideradas patogênicas e capazes de explicar as MCs observadas nos pacientes (Tabela 2). O gene *DLL1* apresenta-se como melhor candidato para a MC observada na paciente com a deleção 6q27, que é uma síndrome de microdeleção complexa com expressividade variável e sem um gene específico definido que possa explicar o quadro dos pacientes. Já a deleção em 9q34 caracteriza a síndrome de Kleefstra, uma síndrome bem definida, que pode apresentar MCs, e o gene responsável é o *EHMT1*. Por fim, a síndrome de microdeleção 1q21 apresenta alta variabilidade de expressão e há casos descritos de pacientes com MCs, apesar de ser um sinal incomum, presente em menos de 10% dos pacientes. Os genes *CHDL1* e *PRKAB2* são considerados os melhores candidatos para as MCs na síndrome de microdeleção 1q21.

Tabela 2 - Descrição das malformações cerebrais encontradas nos pacientes, CNVs identificadas, com tamanho, classificação e genes candidatos

Paciente	Malformação cerebral	CNV	Tamanho da CNV (kpbs)	Classificação da CNV	Genes candidatos
HUB1	Hidrocefalia com redução da substância branca periventricular, redução volumétrica do mesencéfalo	del6q27	325	Patogênica	DLL1
HUB2	Afilamento difuso do corpo caloso, mesencéfalo e do restante do tronco cerebral	del9q34	120	Patogênica	EHMT1

Continua

Tabela 3 - Descrição das malformações cerebrais encontradas nos pacientes, CNVs identificadas, com tamanho, classificação e genes candidatos

Paciente	Malformação cerebral	Tipo de CNV	Tamanho da CNV (kpbs)	Classificação da CNV	Genes candidatos
HUB3	Variante de Dandy Walker: hipoplasia de parte do verme cerebelar, comunicando porção posterior do 4º ventrículo com cisterna magna alargada	del22q11	653	VOUS	-
SC1	Holoprosencefalia alobar, microcefalia	del9p24	98	Potencialmente patogênica	-
SC2	Paquigiria, agenesia de septo pelúcido, microcefalia	dup11q23	229	Potencialmente patogênica	-
		dup3q29	192	Potencialmente patogênica	-
SC3	Hidrocefalia congênita: DVP, acentuada hidrocele supratentorial, encefalomalácia, apagamento de sulcos e fissuras corticais. Mielomeningocele	del1q21	2.7	Patogênica	CHDL1 e PRKAB2
SC4	agenesia de septo pelúcido, hidrocefalia supratentorial, com sinais de hipertensão associada	del2q12	1.5	VOUS	-
SC5	Desproporção craniofacial, com sinal de redução volumétrica encefálica	dup12p13	310	VOUS	-
		dup12p13	101	VOUS	-

As CNVs del9p24, dup3q29 e dup11q23 foram consideradas potencialmente patogênicas, mas não há indícios suficientes na literatura para classificá-las como causadoras das MCs encontradas nos pacientes.

As CNVs del22q11, del2q12 e dup12p13 foram consideradas VOUS, não existindo indícios suficientes para classificá-las como causadoras das MCs encontradas nos pacientes ou do quadro clínico observado como um todo. A interpretação da CNV pode mudar à medida que mais estudos forem realizados nessas regiões e mais pacientes forem registrados nos bancos de dados, permitindo uma melhor relação genótipo-fenótipo.

Para os pacientes cujo resultado da CMA foi normal, é recomendada a realização de exoma. Esse exame é capaz de sequenciar todas as sequências codificadoras do genoma e é o próximo passo na investigação genética. O exoma é capaz de identificar mutações menores que as CNVs detectadas pela CMA e sua interpretação é mais simples que um sequenciamento de genoma completo, que seria o passo seguinte, após um resultado de exoma normal. Um sequenciamento de genoma completo tem a vantagem de avaliar o acometimento de regiões não codificadoras, como regiões de enhancers, promotores e miRNAs.

Por último, é importante ressaltar que este estudo investiga características genéticas dos indivíduos investigados, mas outros mecanismos adicionais podem ser importantes para a etiologia das MCs observadas. Entre os possíveis mecanismos adicionais encontram-se efeitos dos genes deletados na regulação de genes adjacentes, efeitos epigenéticos e possíveis mutações de ponto que possam estar interagindo com os genes deletados.

REFERÊNCIAS

1. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology E-Book [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2014. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=XQuqBAAAQBAJ>
2. Bano S, Chaudhary V, Yadav S. Congenital Malformation of the Brain. In: Bright P, editor. Neuroimaging [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2012. Available from: <https://doi.org/10.5772/22936>
3. WHO/CDC/ICBDSR. Birth defects surveillance: atlas of selected congenital anomalies. WHO Libr Cat Data. 2014;1–28.
4. de Bakker BS, Driessen S, Boukens BJD, van den Hoff MJB, Oostra RJ. Single-site neural tube closure in human embryos revisited. *Clin Anat*. 2017;30(7):988–99.
5. Borsani E, Della Vedova AM, Rezzani R, Rodella LF, Cristini C. Correlation between human nervous system development and acquisition of fetal skills: An overview. *Brain Dev* [Internet]. The Japanese Society of Child Neurology; 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.10.009>
6. Smith JL, Schoenwolf GC. Neurulation: Coming to closure. *Trends Neurosci*. 1997;20(11):510–7.
7. Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: Migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(10):795–805.
8. Youmans JR, Winn HR. Youmans neurological surgery, 6th ed. Volume 1, Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2011. p. 81.
9. Huang X, Saint-Jeannet JP. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol*. 2004;275(1):1–11.
10. Bürglin TR, Affolter M. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* [Internet]. Chromosoma; 2016;125(3):497–521. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8>
11. Gehring WJ. The homeobox in perspective. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(8):277–80.
12. Ulloa F, Martí E. Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn*. 2010;239(1):69–76.
13. Elshazzly M, Caban O. Embryology, Central Nervous System. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526024/>
14. Gray H, Lewis WH. Anatomy of the human body, 20th ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1918. pg. 807. Available from: <https://archive.org/stream/anatomyofhumanbo1918gray#page/806/mode/2up>
15. Fuhrmann S, Levine EM, Reh TA. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development*. 2000;127(21):4599–609.
16. Yachnis AT, Rorke LB. Cerebellar and brainstem development: An overview in relation to Joubert

- syndrome. *J Child Neurol*. 1999;14(9):570–3.
17. Ngeles Fernández-Gil M, Palacios-Bote R, Leo-Barahona M, Mora-Encinas JP. Anatomy of the brainstem: A gaze into the stem of life. *Semin Ultrasound, CT MRI* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;31(3):196–219. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sult.2010.03.006>
 18. The basic laminar pattern of the cerebral cortex. In: *Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex: The Principles of Comparative Localisation in the Cerebral Cortex Based on Cytoarchitectonics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 13–36. Available from: https://doi.org/10.1007/0-387-26919-3_2
 19. Palomero-Gallagher N, Zilles K. Cortical layers: Cyto-, myelo-, receptor- and synaptic architecture in human cortical areas. *Neuroimage* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;(April):1–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.08.035>
 20. Marin-Padilla M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)*. 1978;152(2):109–26.
 21. Wright BLC, Lai JTF, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol* [Internet]. 2012;259(8):1530–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-012-6413-x>
 22. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2011;128(6):309–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
 23. Logan BM, Reynolds P, Rice S, Hutchings RT. *McMinn's Color Atlas of Head and Neck Anatomy* [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2016. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=wuHZDAAAQBAJ>
 24. Jones KL, Jones MC, Del Campo M. Introduction In: *Smith's Recognizable Patterns Of Human Malformation*. 7th edition. Philadelphia, PA: Saunders, 2013. p. 1-6.
 25. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principles of Neural Science, Fourth Edition* [Internet]. McGraw-Hill Companies, Incorporated; 2000. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=yMtpAAAAMAAJ>
 26. Gerber JC, Neuhann TM, Tyshchenko N, Smitka M, Hackmann K. Expanding the clinical and neuroradiological phenotype of 6q27 microdeletion: Olfactory bulb aplasia and anosmia. *Am J Med Genet Part A*. 2011;155(8):1981–6.
 27. Rigon C, Salviati L, Mandarano R, Donà M, Clementi M. 6q27 subtelomeric deletions: Is there a specific phenotype? *Am J Med Genet Part A*. 2011;155(5):1213–4.
 28. Centers for Disease Control and Prevention. *Spina bifida: Facts*. Available at: <http://www.cdc.gov/ncbddd/spinabifida/facts.html> [Accessed 2019 jan 28]
 29. GROUP MVSR. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991;338(8760):131–7.

30. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the First Occurrence of Neural-Tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. *N Engl J Med* [Internet]. 1992;327(26):1832–5. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM199212243272602>
31. Lupo PJ, Agopian AJ, Castillo H, Castillo J, Clayton GH, Dosa NP, et al. Genetic epidemiology of neural tube defects. *J Pediatr Rehabil Med*. 2017;10(3–4):189–94.
32. Neto, FC. *A Formação Das Vesículas Encefálicas Primárias E Secundárias*. Available at: http://correio.rac.com.br/_conteudo/2015/08/colunistas/feres_chaddad_netto/338368-a-formacao-das-vesiculas-encefalicas-primarias-e-secundarias.html [Accessed 2019 jan 29].
33. Fernandes M, Gutin G, Alcorn H, McConnell SK, Hebert JM. Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development* [Internet]. 2007;134(21):3789–94. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.004325>
34. Dupé V, Rochard L, Mercier S, Le Pétilion Y, Gicquel I, Bendavid C, et al. NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 2011;20(6):1122–31.
35. Aldinger KA, Doherty D. HHS Public Access. 2017;21(5):321–32.
36. Edwards TJ, Sherr EH, Barkovich AJ, Richards LJ. Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. *Brain*. 2014;137(6):1579–613.
37. Barkovich AJ, Dobyns WB, Guerrini R. Malformations of Cortical Development and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 May 1;5(5). Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/5/a022392.abstract>
38. Conti V, Carabalona A, Pallesi-Pocachard E, Parrini E, Leventer RJ, Buhler E, et al. Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome: Role of the C6orf70 gene. *Brain*. 2013;136(11):3378–94.
39. Guerrini R, Dobyns WB. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014/06/02. 2014 Jul;13(7):710–26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932993>
40. Dobyns WB, Mirzaa G, Christian SL, Petras K, Roseberry J, Clark GD, et al. Consistent chromosome abnormalities identify novel polymicrogyria loci in 1p36.3, 2p16.1-p23.1, 4q21.21-q22.1, 6q26-q27, and 21q2. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2008 Jul 1;146A(13):1637–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18536050>
41. Parrini E, Conti V, Dobyns WB, Guerrini R. Genetic basis of brain malformations. *Mol Syndromol*. 2016;7(4):220–33.
42. Kubota N, Yokoyama T, Hoshi N, Suyama M. Identification of a candidate enhancer for DMRT3 involved in spastic cerebral palsy pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;496(1):133–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.011>
43. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol*. 2005;282(1):1–13.

44. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of Retinoid Metabolism and Function. 2005;606–30.
45. Durston AJ, Timmermans JPM, Hage WJ, Hendriks HFJ, De Vries NJ, Heideveld M, et al. Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature*. 1989;340(6229):140–4.
46. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):755–65.
47. Azais-braesco V, Pascal G. Vitamin A in pregnancy requirements and safe. 2018;71(June).
48. Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol*. 1996;6(4):417–26.
49. Marti E, Takada R, Bumcrot DA, Sasaki H, McMahon AP. Distribution of Sonic-Hedgehog Peptides in the Developing Chick and Mouse Embryo. *Development*. 1995;121:2537–47.
50. Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* [Internet]. 2008;135(15):2489–503. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.009324>
51. Hébert JM, Fishell G. The genetics of early telencephalon patterning: Some assembly required. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(9):678–85.
52. Shimamura K, Rubenstein JL, Shimamura J L KAUR, Shimamura K, Rubenstein JL. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* [Internet]. 1997;124(14):2709–18. Available from: <papers2://publication/uuid/E4B2974F-4505-4D3A-B257-FD0822074ABF%5Cnpapers2://publication/uuid/3330D332-2FCD-462D-AE34-AB80F1FEA723%5Cnhttp://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9226442&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://pub>
53. Rash BG, Grove EA. Patterning the Dorsal Telencephalon: A Role for Sonic Hedgehog? *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(43):11595–603. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3204-07.2007>
54. Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5–6):341–2.
55. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;1(1):87–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.07.005>
56. Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P. BMP signaling in development and diseases: A pharmacological perspective. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2013;85(7):857–64. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213000415>
57. Caronia-Brown G, Yoshida M, Gulden F, Assimacopoulos S, Grove EA. The cortical hem regulates the size and patterning of neocortex. *Development* [Internet]. 2014;141(14):2855–65. Available from: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.106914>

58. Mulligan KA, Cheyette BNR. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(4):774–87.
59. Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner LM, Märki D, Büchmann-Møller S, et al. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol*. 2007;304(1):394–408.
60. Stewart S, Gomez AW, Armstrong BE, Henner A, Stankunas K. Sequential and opposing activities of Wnt and BMP coordinate zebrafish bone regeneration. *Cell Rep* [Internet]. The Authors; 2014;6(3):482–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.010>
61. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215–66.
62. Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol*. 2005;283(1):113–27.
63. Crossley PH, Martin GR. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. 1995;121(2):439–51.
64. Pang D, Thompson DNP, Pang D. Embryology and bony malformations of the craniovertebral junction. 2011;523–64.
65. Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Mol Genet Metab* [Internet]. The Authors; 2014;111(1):4–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.10.012>
66. Quintero-Ronderos P, Laissue P. The multisystemic functions of FOXD1 in development and disease. *J Mol Med. Journal of Molecular Medicine*; 2018;96(8):725–39.
67. Katoh M. et al. Human FOX gene family. *Int J Oncol*. 2004;25(5):1495–500.
68. Hou L, Srivastava Y, Jauch R. Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;63:2–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.005>
69. Artavanis-Tsakonas S. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* (80-) [Internet]. 1999;284(5415):770–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5415.770>
70. Swiatek PJ, Lindsell CE, Del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch 1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev*. 1994;8(1992):707–19.
71. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Feb 1;7:93. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrn1847>
72. Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All

Rights Reserved.; 2011 Apr 20;12:269. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrn3024>

73. Diez del Corral R, Breitkreuz DN, Storey KG. Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development* [Internet]. 2002;129(7):1681–91.
74. Lopez SL. Notch activates sonic hedgehog and both are involved in the specification of dorsal midline cell-fates in *Xenopus*. *Development* [Internet]. 2003;130(10):2225–38. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00443>
75. Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* [Internet]. Nature Publishing Group; 2005 May 25;8:709. Available from: <https://doi.org/10.1038/nn1475>
76. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Organogenesis and the Patterning of Appendages. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26901/>
77. Fiddes IT, Lodewijk GA, Mooring M, Bosworth CM, Ewing AD, Mantalas GL, et al. Human-Specific NOTCH2NL Genes Affect Notch Signaling and Cortical Neurogenesis. *Cell* [Internet]. Elsevier; 2018;173(6):1356–1369.e22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.051>
78. Yoon K. Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Promotes Radial Glial Identity and Interacts with Notch1 Signaling in Telencephalic Progenitors. *J Neurosci* [Internet]. 2004;24(43):9497–506. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0993-04.2004>
79. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development*. 1999;126(15):3415–24.
80. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(5):723–30.
81. Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ. Risk factors for cytogenetically normal holoprosencephaly in California: A population-based case-control study. *Am J Med Genet*. 2000;90(4):320–5.
82. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. United States; 1985 Oct;313(14):837–41.
83. Mondal D, R Shenoy S, Mishra S. Retinoic Acid Embryopathy. *Int J Appl basic Med Res* [Internet]. Medknow Publications & Media Pvt Ltd; 2017;7(4):264–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29308367>
84. Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, Araujo BSH, Alvizi L, Soares-Schanoski A, et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–11.
85. RL N, Blanc W. Pathogenesis of congenital rubella. *JAMA* [Internet]. 1965 Dec 20;194(12):1277–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1965.03090250011002>
86. Spranger J, Benirschke K, Hall JG, Lenz W, Lowry RB, Opitz JM, et al. Errors of morphogenesis:

- Concepts and terms. Recommendations of an International Working Group. *J Pediatr*. 1982;100(1):160–5.
87. Rothman KJ, Greenland S. Causation and causal inference in epidemiology. *Am J Public Health*. 2005;95(SUPPL. 1):144–50.
 88. Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology* [Internet]. Lippincott-Raven; 1998. (Modern Epidemiology). Available from: https://books.google.com.br/books?id=DI_JAAAACAAJ
 89. Carolina ANA, Figueiredo V. No Title. 2016;
 90. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;93(1):22–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.012>
 91. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444–54.
 92. Watson CT, Tomas M-B, Sharp AJ, Mefford HC. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2014;15(1):215–44. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genom-091212-153408>
 93. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004;36(9):949–51.
 94. Vissers LELM, De Vries BBA, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: From copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47(5):289–97.
 95. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* [Internet]. The American Society of Human Genetics; 2009;84(4):524–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010>
 96. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. United States; 2007 Nov;145C(4):335–45.
 97. Bailey JA, Eichler EE. Primate segmental duplications: Crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet*. 2006;7(7):552–64.
 98. Ionita-laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA. VARIATION (CNVs) IN HUMAN DISEASE PATHOGENESIS. 2010;93(1):22–6.
 99. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, et al. Relative Impact of Nucleotide and Copy Number Variation on Gene Expression Phenotypes. *Science* (80-) [Internet]. 2007;315(5813):848–53. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1136678>
 100. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical

- diagnostics. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(5):528–33.
101. Faria RS. Caracterização de cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray
Caracterização de cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray. 2015;
 102. Gijsbers ACJ, Lew JYK, Bosch CAJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, den Hollander NS, et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: Test arrays first. *Eur J Hum Genet* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;17(11):1394–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.74>
 103. Paskulin GA, Lorenzen MB, Rosa RFM, Graziadio C, Zen PRG. Importance of the fibroblast chromosomal analysis in suspected cases of mosaicism: experience of a Clinical Genetics service. *Rev paul pediatr*. 2011;29(1):73–9.
 104. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2009;52(4):161–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2009.03.015>
 105. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet* [Internet]. The American Society of Human Genetics; 2010;86(5):749–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006>
 106. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet*. 2010;19(7):1263–75.
 107. Hehir-Kwa J, Pfundt R, Veltman J, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet*. 2013;84(5):415–21.
 108. Saccone S, De Sario a, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(11):4913–7.
 109. Cheung SW, Shaw CA, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A, et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med*. 2005;7(6):422–32.
 110. Peddibhotla S, Nagamani SC, Erez A, Hunter J V, Holder Jr JL, Carlin ME, et al. Delineation of candidate genes responsible for structural brain abnormalities in patients with terminal deletions of chromosome 6q27. *Eur J Hum Genet* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;23(1):54–60. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2014.51>
 111. Paciorkowski AR, Keppler-Noreuil K, Robinson L, Sullivan C, Sajan S, Christian SL, et al. Deletion 16p13.11 uncovers NDE1 mutations on the non-deleted homolog and extends the spectrum of severe microcephaly to include fetal brain disruption. *Am J Med Genet Part A*. 2013;161(7):1523–

- 30.
112. No Title. 2015;
 113. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: Updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*. 2009;11(3):139–46.
 114. Hu T, Kruszka P, Martinez AF, Ming JE, Shabason EK, Raam MS, et al. Cytogenetics and holoprosencephaly: A chromosomal microarray study of 222 individuals with holoprosencephaly. 2018;(April):175–86.
 115. World Health Organization. Birth defects Report by the Secretariat: Sixty-third World Health Assembly. *World Health*. 2010;(May 2006):17–9.
 116. World Health Organization, 2016. Congenital anomalies. Retrieved from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>
 117. Lenhard W, Breitenbach E, Ebert H, Schindelbauer-Deutscher HJ, Henn W. Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: Lessons from down syndrome. *Am J Med Genet*. 2005;133 A(2):170–5.
 118. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) [Internet]. Karger; 2016. (An International system for human cytogenetic nomenclature). Available from: <https://books.google.com.br/books?id=0y3JwEACAAJ>
 119. The Structure, Function, and Applications of GeneChip® Microarrays (n.d), 2005. [Updated 2019 jan 29]. Available from: http://www.affymetrix.com/about_affymetrix/outreach/educator/downloads/chip_function_teacher_notes.pdf
 120. Gijsbers ACJ, Schoumans J, Ruivenkamp CAL. Interpretation of array comparative genome hybridization data: A major challenge. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135(3–4):222–7.
 121. Eash D, Waggoner D, Chung J, Stevenson D, Martin CL. Calibration of 6q subtelomere deletions to define genotype/phenotype correlations. *Clin Genet*. 2005;67(5):396–403.
 122. Kawaguchi D, Yoshimatsu T, Hozumi K, Gotoh Y. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development*. 2008;135(23):3849–58.
 123. de Angelis MH, McIntyre II J, Gossler A. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 1997 Apr 17;386:717. Available from: <https://doi.org/10.1038/386717a0>
 124. Rubio-Aliaga I, Przemecck GKH, Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Hans W, et al. Dll1 haploinsufficiency in adult mice leads to a complex phenotype affecting metabolic and immunological processes. *PLoS One*. 2009;4(6).
 125. Rooms L, Reyniers E, Scheers S, van Luijk R, Wauters J, Van Aerschot L, et al. TBP as a candidate

- gene for mental retardation in patients with subtelomeric 6q deletions. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(10):1090–6.
126. Martianov I, Viville S, Davidson I. RNA Polymerase II Transcription in Murine Cells Lacking the TATA Binding Protein. *Science* (80-) [Internet]. 2002;298(5595):1036–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1076327>
 127. Tamura T, Lee DH, Osaka F, Fujiwara T, Shin S, Chung CH, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs for five major subunits of human proteasomes (multi-catalytic proteinase complexes). *BBA - Gene Struct Expr.* 1991;1089(1):95–102.
 128. Goldberg AL, Stein R, Adams J. New insights into proteasome function: from archaebacteria to drug development. *Chem Biol.* 1995;2(8):503–8.
 129. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2).
 130. Narimatsu M, Bose R, Pye M, Zhang L, Miller B, Ching P, et al. Regulation of Planar Cell Polarity by Smurf Ubiquitin Ligases. *Cell* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;137(2):295–307. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.025>
 131. Kawakami T, Furukawa Y, Sudo K, Saito H, Takami S, Takahashi E, et al. Isolation and mapping of a human gene (PDCD2) that is highly homologous to Rp8, a rat gene associated with programmed cell death. *Cytogenet Cell Genet. Switzerland;* 1995;71(1):41–3.
 132. Baron BW, Zeleznik-Le N, Baron MJ, Theisler C, Huo D, Krasowski MD, et al. Repression of the PDCD2 gene by BCL6 and the implications for the pathogenesis of human B and T cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007;104(18):7449–54. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34250643997&partnerID=tZOtx3y1>
 133. Trachtulec Z, Forejt J. Synteny of orthologous genes conserved in mammals, snake, fly, nematode, and fission yeast. *Mamm Genome.* 2001;12(3):227–31.
 134. Holden S, Raymond FL. The human gene CXorf17 encodes a member of a novel family of putative transmembrane proteins: cDNA cloning and characterization of CXorf17 and its mouse ortholog orf34. *Gene.* 2003;318(1–2):149–61.
 135. Li D, Kang Q, Wang D-M. Constitutive Coactivator of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ), a Novel Coactivator of PPAR γ that Promotes Adipogenesis. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2007;21(10):2320–33. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2006-0520>
 136. Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, et al. miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY).* 2010;2(7):415–31.
 137. Siew W-H, Tan K-L, Babaei MA, Cheah P-S, Ling K-H. MicroRNAs and intellectual disability (ID) in Down syndrome, X-linked ID, and Fragile X syndrome. *Front Cell Neurosci* [Internet].

- 2013;7(April):1–13. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00041/abstract>
138. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, Yoneda T, Ekuni D, Azuma T, et al. MIR 1246 and MIR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(4):2375–81.
139. Merla G, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot M-T, et al. Submicroscopic Deletion in Patients with Williams-Beuren Syndrome Influences Expression Levels of the Nonhemizygous Flanking Genes. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006;79(2):332–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707631401>
140. Mosca AL, Callier P, Masurel-Paulet A, Thauvin-Robinet C, Marle N, Nouchy M, et al. Cytogenetic and array-CGH characterization of a 6q27 deletion in a patient with developmental delay and features of Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2010;152(5):1314–7.
141. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* 2005;42(2):121–8.
142. Ming JE, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet.* 2002;71(5):1017–32.
143. D'Ambrosio V, Votino C, Cos T, Boulanger S, Dheedene A, Jani J, et al. Role of CGH array in the diagnosis of autosomal recessive disease: A case of Ellis-van Creveld syndrome. *Prenat Diagn.* 2015;35(1):97–9.
144. Mcauley JB. Congenital Toxoplasmosis. 2014;3:30–5.
145. Kleefstra T, Smidt M, Banning MJG, Oudakker AR, Van Esch H, De Brouwer APM, et al. Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *J Med Genet.* 2005;42(4):299–306.
146. Kleefstra T, Van Zelst-Stams WA, Nillesen WM, Cormier-Daire V, Houge G, Foulds N, et al. Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet.* 2009;46(9):598–606.
147. Kleefstra T, de Leeuw N. Kleefstra Syndrome. 2010 Oct 5 [Updated 2019 Mar 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47079/>
148. Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Ogawa H, Ishiguro K, et al. Linked references are available on JSTOR for this article : Complex with with Chromatin Chromatin Modifiers Modifiers That That Occupies Occupies E2F- and Myc-Responsive Myc-Responsive Genes Genes in in Go Cells. 2002;296(5570):1132–6.
149. Groen JL, Andrade A, Ritz K, Jalalzadeh H, Haagmans M, Bradley TEJ, et al. CACNA1B mutation is linked to unique myoclonus-dystonia syndrome. *Hum Mol Genet.* 2015;24(4):987–93.

150. Uitti RJ, Maraganore DM. Adult onset familial cervical dystonia: Report of a family including monozygotic twins. *Mov Disord*. 1993;8(4):489–94.
151. Groen J, van Rootselaar A-F, van der Salm SMA, Bloem BR, Tijssen M. A new familial syndrome with dystonia and lower limb action myoclonus. *Mov Disord*. United States; 2011 Apr;26(5):896–900.
152. Chang L, Shukla DK. Imaging studies of the HIV-infected brain [Internet]. 1st ed. Vol. 152, *The Neurology of HIV Infection*. Elsevier B.V.; 2018. 229-264 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63849-6.00018-9>
153. Liu DPC, Burrowes DM, Qureshi MN. Cyclopia : Craniofacial Appearance on MR and Three-Dimensional CT. 1997;543–6.
154. Barral MFM, de Oliveira GR, Lobato RC, Mendoza-Sassi RA, Martinez AMB, Goncalves C V. Risk factors of HIV-1 vertical transmission (VT) and the influence of antiretroviral therapy (ART) in pregnancy outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Brazil; 2014;56(2):133–8.
155. Wang Y, Onishi Y, Kakinuma N, Roy BC, Aoyagi T, Kiyama R. Alternative splicing of the human Kank gene produces two types of Kank protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(4):1247–53.
156. Ding M. C. elegans ankyrin repeat protein VAB-19 is a component of epidermal attachment structures and is essential for epidermal morphogenesis. *Development* [Internet]. 2003;130(23):5791–801. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00791>
157. Lerer I, Sagi M, Meiner V, Cohen T, Zlotogora J, Abeliovich D. Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum Mol Genet*. 2005;14(24):3911–20.
158. Vanzo RJ, Martin MM, Sdano MR, South ST. Familial KANK1 deletion that does not follow expected imprinting pattern. *Eur J Med Genet*. Elsevier Masson SAS; 2013;56(5):256–9.
159. Tassano E, Accogli A, Pavanello M, Bruno C, Capra V, Gimelli G, et al. Interstitial 9p24.3 deletion involving only DOCK8 and KANK1 genes in two patients with non-overlapping phenotypic traits. *Eur J Med Genet* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2016;59(1):20–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.11.011>
160. Ness JK, Romanko MJ, Rothstein RP, Wood TL, Levison SW. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci*. 2001;23(3):203–8.
161. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int*. 1997;51(2):553–5.
162. Jeffries AR, Collier DA, Vassos E, Curran S, Ogilvie CM, Price J. Random or stochastic monoallelic expressed genes are enriched for neurodevelopmental disorder candidate genes. *PLoS One*. 2013;8(12):1–6.
163. Jeffries AR, Perfect LW, Ledderose J, Schalkwyk LC, Bray NJ, Mill J, et al. Stochastic choice of

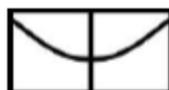
- allelic expression in human neural stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(9):1938–47.
164. Whatley SD, Woolf JR, Elder GH. Comparison of complementary and genomic DNA sequencing for the detection of mutations in the HMBS gene in British patients with acute intermittent porphyria: Identification of 25 novel mutations. *Hum Genet*. 1999;104(6):505–10.
165. Grandchamp B, De Verneuil H, Beaumont C, Chretien S, Walter O, Nordmann Y. Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. *Eur J Biochem*. England; 1987 Jan;162(1):105–10.
166. Veiga-Da-Cunha M, Gerin I, Chen Y-T, De Barsey T, De Lonlay P, Dionisi-Vici C, et al. A Gene on Chromosome 11q23 Coding for a Putative Glucose- 6-Phosphate Translocase Is Mutated in Glycogen-Storage Disease Types Ib and Ic. *Am J Hum Genet*. 1998;63(Mim 232200):976–83.
167. Belaya K, Finlayson S, Slater CR, Cossins J, Liu WW, Maxwell S, et al. Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates. *Am J Hum Genet*. 2012;91(1):193–201.
168. Zhang J, Lachance V, Schaffner A, Li X, Fedick A, Kaye LE, et al. A Founder Mutation in VPS11 Causes an Autosomal Recessive Leukoencephalopathy Linked to Autophagic Defects. *PLoS Genet*. 2016;12(4):1–21.
169. Tassano E, Uccella S, Giacomini T, Severino M, Siri L, Gherzi M, et al. 3q29 microduplication syndrome: Description of two new cases and delineation of the minimal critical region. *Eur J Med Genet* [Internet]. Elsevier; 2018;61(8):428–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.02.011>
170. Lawrence MB, Arreola A, Cools M, Elton S, Wood KS. 3q29 Chromosomal duplication in a neonate with associated myelomeningocele and midline cranial defects. *Clin Dysmorphol*. 2017;26(4):221–3.
171. Fernández-Jaén A, Castellanos M del C, Fernández-Perrone AL, Fernández-Mayoralas DM, de la Vega AG, Calleja-Pérez B, et al. Cerebral palsy, epilepsy, and severe intellectual disability in a patient with 3q29 microduplication syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2014;164(8):2043–7.
172. Goobie S, Knijnenburg J, FitzPatrick D, Sharkey FH, Lionel AC, Marshall CR, et al. Molecular and clinical characterization of de novo and familial cases with microduplication 3q29: Guidelines for copy number variation case reporting. *Cytogenet Genome Res*. 2009;123(1–4):65–78.
173. Assoum M, Salih MA, Drouot N, Hnia K, Martelli A, Koenig M. The salih ataxia mutation impairs rubicon endosomal localization. *Cerebellum*. 2013;12(6):835–40.
174. Assoum M, Salih MA, Drouot N, Dorra H'Mida-Ben B, Lagier-Tourenne C, Aldrees A, et al. Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia. *Brain*. 2010;133(8):2439–47.
175. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* [Internet].

- Nature Publishing Group; 2009 Mar 8;11:385. Available from: <https://doi.org/10.1038/ncb1846>
176. Hautbergue GM, Hung ML, Walsh MJ, Snijders APL, Chang C Te, Jones R, et al. UIF, a New mRNA Export Adaptor that Works Together with REF/ALY, Requires FACT for Recruitment to mRNA. *Curr Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;19(22):1918–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.041>
 177. Pan Q, Zhu YJ, Gu BW, Cai X, Bai XT, Yun HY, et al. A new fusion gene NUP98-IQCG identified in an acute T-lymphoid/myeloid leukemia with a t(3;11)(q29q13;p15)del(3)(q29) translocation. *Oncogene*. 2008;27(24):3414–23.
 178. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet*. United States; 2008 Dec;40(12):1466–71.
 179. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, et al. Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotypes. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;359(16):1685–99. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805384>
 180. Haldeman-Englert CR, Jewett T. 1q21.1 Recurrent Microdeletion. 2011 Feb 24 [Updated 2015 Nov 12]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52787/181>. Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, Pojman N, et al. Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet Med*. IOP Publishing; 2016;18(4):341–9.
 182. NIH. *Hydrocephalus fact sheet*. Available at: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Hydrocephalus-Fact-Sheet> [Accessed 2019 Jan 29].
 183. Pereira RM, Mazeti L, Cristina D, Lopes P. Hidrocefalia de pressão normal: visão atual sobre a fisiopatologia, diagnóstico e tratamento Normal pressure hydrocephalus: current view on pathophysiology, diagnosis and treatment. 2012;91(2):96–109.
 184. Doggett NA, Xie G, Meincke LJ, Sutherland RD, Mundt MO, Berbari NS, et al. A 360-kb interchromosomal duplication of the human HYDIN locus. *Genomics* [Internet]. 2006;88(6):762–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754306002138>
 185. Davy BE, Robinson ML. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet*. 2003;12(10):1163–70.
 186. Harvard C, Strong E, Mercier E, Colnaghi R, Alcantara D, Chow E, et al. Understanding the impact of 1q21.1 copy number variant. *Orphanet J Rare Dis*. BioMed Central Ltd; 2011;6(1):1–12.
 187. Dasgupta B, Milbrandt J. AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev Cell*. United States; 2009 Feb;16(2):256–70.
 188. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 2011;90(1):1–18.

189. Shaikh TH, Gai X, Perin JC, Glessner JT, Xie H, Murphy K, et al. High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: A data resource for clinical and research applications. *Genome Res.* 2009;19(9):1682–90.
190. Zhou JY, Fogelgren B, Wang Z, Roe BA, Biegel JA. Isolation of genes from the rhabdoid tumor deletion region in chromosome band 22q11.2. *Gene.* 2000;241(1):133–41.
191. Blatt C, Eversole-Cire P, Cohn VH, Zollman S, Fournier RE, Mohandas LT, et al. Chromosomal localization of genes encoding guanine nucleotide-binding protein subunits in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(20):7642–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
192. Fong HK, Yoshimoto KK, Eversole-Cire P, Simon MI. Identification of a GTP-binding protein alpha subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(9):3066–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
193. GeneCards. *RAB36* gene. Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAB36#function> [Accessed 2019 Jan 21].
194. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001;61(6):2343–55.
195. Lewis VO, Gehrman M, Weissbach L, Hyman JE, Rielly A, Jones DG, et al. Homologous plasminogen N-terminal and plasminogen-related gene A and B peptides. Characterization of cDNAs and recombinant fusion proteins. *Eur J Biochem.* England; 1999 Feb;259(3):618–25.
196. Takashima S, Tsuji S, Tsujimoto M. Characterization of the second type of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Gal β 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially: Genomic analysis of human sialyltransferase genes. *J Biol Chem.* 2002;277(48):45719–28.
197. Krzewinski-Recchi MA, Julien S, Juliant S, Teinturier-Lelièvre M, Samyn-Petit B, Montiel MD, et al. Identification and functional expression of a second human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *Eur J Biochem.* 2003;270(5):950–61.
198. Ciccarelli FD, von Mering C, Suyama M, Harrington ED, Izaurralde E, Bork P. Complex genomic rearrangements lead to novel primate gene function. *Genome Res.* 2005;15(3):343–51.
199. Neilson DE, Adams MD, Orr CMD, Schelling DK, Eiben RM, Kerr DS, et al. Infection-Triggered Familial or Recurrent Cases of Acute Necrotizing Encephalopathy Caused by Mutations in a Component of the Nuclear Pore, RANBP2. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):44–51.
200. Bauché S, O'Regan S, Azuma Y, Laffargue F, McMacken G, Sternberg D, et al. Impaired Presynaptic High-Affinity Choline Transporter Causes a Congenital Myasthenic Syndrome with Episodic Apnea.

- Am J Hum Genet. 2016;99(3):753–61.
201. McEntagart M, Norton N, Williams H, Teare MD, Dunstan M, Baker P, et al. Localization of the Gene for Distal Hereditary Motor Neuronopathy VII (dHMN-VII) to Chromosome 2q14. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2001;68(5):1270–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292970761235X>
 202. Barwick KES, Wright J, Al-Turki S, McEntagart MM, Nair A, Chioza B, et al. Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. *Am J Hum Genet* [Internet]. The American Society of Human Genetics; 2012;91(6):1103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.019>
 203. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, et al. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosom Cancer*. 1999;25(2):97–103.
 204. Sigala JLD, Bottero V, Young DB, Shevchenko A, Mercurio F, Verma IM. Activation of transcription factor NF- κ B requires ELKS, an I κ B kinase regulatory subunit. *Science* (80-). 2004;304(5679):1963–7.
 205. Prasad A, Sdano MA, Vanzo RJ, Mowery-Rushton PA, Serrano MA, Hensel CH, et al. Clinical utility of exome sequencing in individuals with large homozygous regions detected by chromosomal microarray analysis. *BMC Med Genet*. *BMC Medical Genetics*; 2018;19(1):1–11.

ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA FM/UNB



Universidade de Brasília

Análise Cromossômica por Microarray em pacientes com malformações cerebrais

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

O (A) senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto: “Análise Cromossômica por Microarray em pacientes com malformações cerebrais”. O objetivo desta pesquisa é identificar novos genes ou regiões genômicas relacionadas à formação do sistema nervoso central.

O (A) senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a).

A sua participação ocorrerá por meio da realização de exames laboratoriais. Os exames serão realizados a partir da coleta de sangue para extração de DNA. O procedimento de coleta de sangue por punção venosa será realizado com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de equimose no local.

É possível que o senhor (a) venha a se beneficiar dos resultados deste projeto, a partir dos resultados dos exames laboratoriais de forma a identificar os genes relacionados à sua condição, permitindo precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo (a) senhor(a).

Informamos que o senhor (a) poderá se recusar a responder qualquer questão (ou participar de qualquer procedimento) que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor(a) e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. Sua participação é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite e mediante comprovação, o senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos **comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador.

Solicitamos também sua autorização para armazenamento de sua amostra biológica de sangue para possíveis outros estudos futuros em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. A amostra apresentará uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para a Professora Aline Pic-Taylor, na Universidade de Brasília, número: (61) 3107-3083, em horário comercial, ou Marcela Dias Hanna, número: (61) 99952-0447 em horário comercial.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do e-mail cepfm@unb.br ou do telefone: (61) 3107-1918 de segunda à sexta-feira, de 8h às 12h e 13h às 16h.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Estou assinando em meu nome.

Estou assinando em nome do meu dependente legal.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Nome / assinatura do voluntário ou responsável legal

Aline Pic-Taylor

_____, ____ de _____ de _____

Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília-UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte- Brasília-DF Brasil - CEP: 70.910-900

Tel: (61) 3107-1918

ANEXO B - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP-FM/UNB

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Cromossômica por Microarray em pacientes com malformações cerebrais

Pesquisador: Aline Pic

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 65343216.1.0000.5558

Instituição Proponente: Instituto de Biologia da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.261.862

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que selecionará cerca de 100 Cerca de 100 pacientes atendidos pelo serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário de Brasília e diagnosticados com malformações cerebrais, que serão convidados a participar da pesquisa. Para a análise genética, será realizada a técnica de Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA), e, como protocolo de rotina do laboratório, também será feito o cariótipo. Para tanto, far-se-á a coleta de 4 a 8 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA ou heparina. As análises do cariótipo serão feitas no Laboratório de Genética Médica na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e a CMA, no Laboratório de Embriologia e Biologia do Desenvolvimento.

Os pesquisadores apresentam os seguintes critérios de inclusão:

Pacientes com malformações cerebrais (como por exemplo malformação de Dandy-Walker, polimicrogiria, lisencefalia e outros casos de agenesia de corpo caloso) isoladamente ou em forma sindrômica.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.261.862

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Buscar alterações cromossômicas submicroscópicas em pacientes com malformações do sistema nervoso central pela Análise Cromossômica por Microarranjo.

Objetivo Secundário:

Identificar novos genes ou regiões genômicas associadas à formação do sistema nervoso central e elucidar a relação genótipo-fenótipo do quadro clínico dos pacientes afetados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos inerentes à coleta de sangue periférico por equipe capacitada e material descartável de boa qualidade (inchaço no local, equimose, entre outros).

Benefícios:

Pacientes participantes e seus familiares serão beneficiados com diagnóstico molecular de ponta além de aconselhamento genético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa em tela demonstra sólida fundamentação teórica, clareza na apresentação do problema e dos objetivos e desenho metodológico adequado. Além disso, conta com a infraestrutura física e pessoal apropriada, bem como aporte financeiro para o custeio de materiais (escritório, coletas e laboratório), alimentação, transporte e pagamentos de serviços (pessoa física e jurídica).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários para apresentação de projetos de pesquisa no GEP/HUB foram inseridos na plataforma de maneira adequada e assinados por todos os responsáveis das áreas envolvidas.

Quanto aos termos de assentimento e consentimento livre e esclarecido, observou-se que apresentaram as informações e os procedimentos da pesquisa de forma clara, detalhada e informal, atingindo desse modo o objetivo de comunicar todos os elementos de tal forma que o participante aceite ou rejeite sua entrada no estudo.

Recomendações:

Ajustar as datas no cronograma de execução do projeto.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 2.261.962

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, recomendo a aprovação da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado pelo relator e encaminhado para esta coordenação. O projeto foi Aprovado pelo Coordenador, Ad Referendum.

De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_820424.pdf	16/02/2017 13:14:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFM.pdf	16/02/2017 13:14:08	Aline Pic	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	11/02/2017 15:08:35	Aline Pic	Aceito
Outros	Termo_de_imagem.pdf	29/01/2017 00:04:08	Aline Pic	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_BioRe p.pdf	29/01/2017 00:03:41	Aline Pic	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoPlataformaBrasil.pdf	01/12/2016 15:41:55	Aline Pic	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Silviene_Fabiana_de_Oliveira.pdf	25/11/2016 22:32:55	Aline Pic	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Marcela_Dias_Hanna.pdf	25/11/2016 22:32:27	Aline Pic	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Mara_Santos_Cordoba.pdf	25/11/2016 22:32:10	Aline Pic	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Juliana_Forte_Mazzeu de Araujo.pdf	25/11/2016 22:31:41	Aline Pic	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Aline_Pic.pdf	25/11/2016 22:31:23	Aline Pic	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.261.862

Outros	Encaminhamento.JPG	25/11/2016 21:56:50	Aline Pic	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aceite.JPG	25/11/2016 21:55:41	Aline Pic	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Responsabilidade.JPG	25/11/2016 21:53:14	Aline Pic	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_dados.pdf	25/11/2016 21:51:55	Aline Pic	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_Assentimento.pdf	25/11/2016 21:49:18	Aline Pic	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/11/2016 18:31:37	Aline Pic	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/11/2016 18:23:50	Aline Pic	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 06 de Setembro de 2017

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (51)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA UFG**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (A) E ESCLARECIDO (A)**

Prezado (a) Senhor (a) responsável, seu (sua) tutelado (a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário (a), de uma pesquisa que oferecerá uma análise genética com a finalidade de verificar se existem alterações associadas à Deficiência Intelectual. Após entender as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo e autorizar seu (sua) tutelado(a), assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você ou seu (sua) filho(a) não serão penalizados de forma alguma.

Pesquisador Responsável: Dr. Vinicius Montenegro Torres (telefone 992396083 ou vini.mtorres@gmail.com)

Equipe: Dra. Nádia Aparecida Bérghamo, sob supervisão da Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (ICB-UFG, tel. 3551-1481).

Informações sobre a pesquisa

Projeto: “Caracterização clínica e diagnóstico genético em pacientes com Deficiência Intelectual indeterminada, de uma instituição de internação crônica em Trindade-Goiás.”

Se você concordar em participar e autorizar a participação do seu (sua) filho(a), será examinado pela médica da equipe (Dr. Vinicius) e depois será coletado sangue. A coleta de sangue será realizada por uma biomédica da equipe capacitada para o procedimento. **Os riscos:** a coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto físico e há possibilidade de aparecer uma mancha roxa (hematoma) na região. Caso apresente algum problema será imediatamente atendido por biomédicos capacitados. Para evitar constrangimentos durante a entrevista e/ou coleta de informações, será atendido

individualmente. O tempo para responder ao questionário e coleta do sangue para os exames solicitados será de aproximadamente trinta minutos.

Os resultados: serão entregues para os pais ou responsáveis e uma cópia de cada exame será arquivada no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da UFG. Os resultados serão divulgados em palestras dirigidas ao público participante, relatórios parciais e finais, apresentação em congressos e artigos científicos.

Garantia de sigilo e privacidade: seus dados serão identificados apenas por códigos e as informações obtidas na triagem do estudo, serão guardadas sob sigilo e poderão ser publicadas em relatórios científicos sem a identificação pessoal. Os questionários serão armazenados em pastas de acesso exclusivo da pesquisadora responsável e será mantido em arquivo sob a responsabilidade da coordenadora da pesquisa, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12 e orientações do CONEP.

A sua participação é voluntária. **Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações** por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a pesquisa sem penalidades ou perda dos benefícios recebidos. Ficará com você uma cópia deste Termo com os telefones dos investigadores, que esclarecerão qualquer dúvida que vier a ocorrer.

Sua participação é voluntária e muito importante para a execução da pesquisa. Ninguém saberá que seu (sua) filho(a) está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos as informações obtidas a estranhos e não identificaremos o nome do (a) seu (sua) filho(a) em hipótese alguma. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar da pesquisadora responsável informações sobre a participação de seu (sua) filho(a) e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos telefones de contato da pesquisadora. A participação de seu (sua) filho(a) consistirá em responder um questionário e seu (sua) filho (a) será examinado, medido sua altura e peso, e faremos a coleta de sangue para exames de genética. As amostras de sangue serão obtidas por coleta na veia, feito com material estéril descartável e de uso individual. Caso concorde em participar desta pesquisa seu (sua) filho(a) será beneficiado com exames gratuitos. Desta forma, pretendemos auxiliar no diagnóstico das causas genéticas da Deficiência Intelectual.

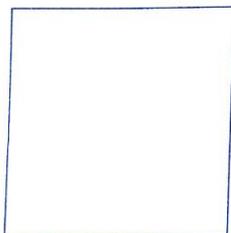
DECLARO que a participação de meu (minha) filho(a) é isenta de despesas.
DECLARO que entendi os objetivos e condições de minha participação na
pesquisa e concordo que meu (minha) filho(a) participe voluntariamente deste
estudo, sem quaisquer penalidades ou qualquer prejuízo.

Eu, _____ abaixo
assinado, documento de identidade nº _____
responsável pelo _____ aluno(a)
_____, autorizo sua
participação na pesquisa.

Fui devidamente informado(a) e esclarecido (a) sobre a pesquisa e os
procedimentos envolvidos. Garantiram-me que posso retirar meu consentimento
a qualquer momento. No caso de novas pesquisas propostas com os dados
coletados, serei informado e permitirei ou não sobre o uso do material biológico.
Em qualquer momento posso retirar o consentimento e deixar de participar desta
pesquisa, sem qualquer prejuízo.

Goiânia, ____/____/_____.

Assinatura do responsável pelo paciente: _____



Sujeito da pesquisa

Impressão digital

Agradecemos sua valiosa colaboração.

Atenciosamente,

Msc. Vinicius Montenegro Torres

Responsável pela pesquisa

ANEXO D – FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP/UGF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-GOIÁS.

Pesquisador: Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 43747315.1.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.144.113

Data da Relatoria: 06/07/2015

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E AUXÍLIO DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL DE UMA INSTITUIÇÃO DE INTERNAÇÃO CRÔNICA EM TRINDADE-GOIÁS. N. CAAE: 43747315.1.0000.5083. Pesquisadora Responsável: Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo.

Trata-se de um estudo com pacientes que apresentam deficiência intelectual idiopática com objetivo de realizar a triagem clínica e genética dos pacientes institucionalizados da Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás. Foram anexados os seguintes documentos: Folha de rosto envolvendo seres humanos, projeto de pesquisa, aprovação do projeto no Conselho Diretor, termo de anuência da diretora da Vila São Cottolengo, termo de compromisso dos pesquisadores, TCLE destinado ao tutor e TCLE destinado aos pais ou responsáveis legais.

Objetivo da Pesquisa:

Tem como objetivo geral realizar a triagem clínica e genética de indivíduos institucionalizados da Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás que apresentem deficiência intelectual idiopática; e como objetivos específicos: Caracterizar clinicamente os indivíduos com DI da Vila São

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

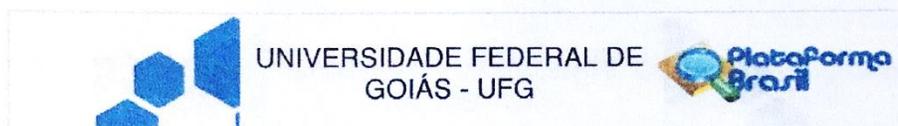
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970

UF: GO **Município:** GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prp@ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

José Cottolengo em Trindade, GO; Analisar o cariótipo em busca de alterações cromossômicas; Analisar as regiões subteloméricas dos cromossomos na busca de anormalidades gênicas nos casos em que o cariótipo apresentar-se normal; Obter dados socio-demográficos e o histórico genético-familiar para subsidiar políticas públicas para o indivíduo com DI; e Fornecer a consultoria genética aos indivíduos e familiares envolvidos na avaliação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos, relatam que: "A coleta do sangue periférico não colocará em risco a vida do indivíduo, visto ser um procedimento simples e realizado por profissionais capacitados. Poderá surgir um desconforto causado pela punção da agulha durante o procedimento da coleta, porém, um efeito passageiro. Na região poderá surgir um leve hematoma que desaparecerá em poucos dias."

Quanto aos benefícios – aos participantes analisados: Os participantes com diagnóstico idiopático de DI institucionalizados poderão ser beneficiados com as análises citogenética e molecular, uma vez que a identificação do diagnóstico específico da DI permite se ter um melhor conhecimento a respeito do curso natural da doença. Isso possibilitaria intervenções, tais como terapia ocupacional, fisioterapia, ou intervenção medicamentosa mais diretivas, as quais melhorariam a qualidade de vida do participante. Aos familiares que apresentarem histórico familiar positivo, serão convidados a participar da pesquisa tendo o acesso a todos os exames e receberão orientação genética, que para tal, será realizada de forma esclarecedora com a utilização de recursos didáticos (gravuras, desenhos, ilustrações) que auxiliam no entendimento.

Quanto aos Benefícios – a comunidade científica: a presente proposta possibilitará a formação e o treinamento de profissionais envolvidos com genética humana em diferentes especialidades, que atuam na UFG, e poderão futuramente atuar nesse campo na saúde pública. Assim, a comunidade que utiliza os serviços de saúde pública será beneficiada com os conhecimentos obtidos. Durante o desenvolvimento do estudo, os resultados parciais serão apresentados em congressos específicos da área e artigos científicos serão publicados em periódicos, além de apresentações e palestras junto a UFG e outras instituições. Outras palestras informativas poderão ser ministradas nas escolas para que os pais e responsáveis conheçam e compreendam a genética, de forma clara e facilitada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo cujos participantes serão indivíduos institucionalizados na Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás que apresentem deficiência intelectual sem causa determinada. A amostra esperada é de 30 internos da instituição, contudo, esse número

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

dependerá da avaliação inicial realizada pela equipe médica. Com relação a faixa etária, serão incluídos crianças, adolescentes e adultos com deficiência intelectual idiopática e serão excluídos indivíduos que apresentem deficiência intelectual causada por fatores exógenos.

Estes pacientes serão avaliados por uma equipe médica, que fará uma anamnese detalhada na busca de distúrbios e malformações congênitas associadas ao quadro de DI. Os indivíduos que apresentarem indicação clínica de avaliação genética serão convidados a participar do estudo. Os pacientes que não apresentarem indicação clínica na anamnese, ou cujo diagnóstico etiológico seja de DI ocasionadas por hipóxia, traumas, meningoencefalites ou outras etiologias conhecidas serão excluídos da avaliação genética.

Amostras de sangue periférico serão coletadas nos indivíduos selecionados, nas quais serão realizadas as análises genéticas. O sangue será coletado por venopunção e separado em duas alíquotas. À primeira porção será adicionada heparina sódica (BD Vacutainer Sodium Heparin 143 USP units) e encaminhada para exames de citogenética clássica. A segunda porção será coletada com o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer K2 EDTA 7,2 mg) e direcionada para as análises moleculares. A coleta de sangue periférico será realizada no laboratório de Análises Clínicas onde os participantes estão institucionalizados. A análise dos dados será realizada utilizando-se softwares apropriados a cada metodologia proposta. Os dados obtidos serão relatados de forma descritiva.

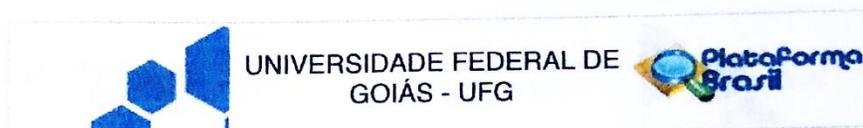
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente estudo será realizado com indivíduos que apresentem deficiência intelectual sem causa determinada, institucionalizados na Vila São José Bento Cottolengo em Trindade-Goiás, administrada pelos Padres Redentoristas e pelas Irmãs Filhas da Caridade de São Vicente de Paulo que estiverem sob a tutela e guarda geral das Irmãs da Vila São Cotollengo, as quais são as responsáveis legais por esses indivíduos e quem autorizarão ou não a participação na pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Também participarão aqueles que estiverem sob tutela provisória na Vila, nos quais os familiares serão contatados para que a pesquisa seja apresentada e serão convidados a participar do estudo. Havendo concordância dos pais ou responsáveis, o TCLE apropriado será aplicado.

A amostra esperada é de 30 participantes da instituição, contudo, esse número dependerá da avaliação inicial realizada pela equipe médica. A idade desses indivíduos poderá variar de 1 a 40 anos de idade. Como esses participantes apresentam comprometimento intelectual e, portanto, não exercem o discernimento para concordarem ou não com a sua participação na pesquisa, o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) não será aplicado, bem como o

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

TCLE para os maiores de 18 anos. O TCLE será aplicado às Irmãs detentoras da tutela e guarda dos internos ou aos pais os responsáveis.

No TCLE está garantido sigilo e privacidade, e que os resultados da pesquisa serão publicadas em relatórios científicos sem sua identificação. Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a pesquisa sem qualquer consequência para a sua pessoa.

Os pesquisadores informam que toda e qualquer avaliação clínica será realizada na Vila São Cotollengo, não havendo a necessidade de se fotografar os participantes, e que a amostra de sangue a ser utilizada na presente análise será obtida quando dos procedimentos de rotina do participante no hospital, a pedido médico, não sendo, portanto, exclusividade da pesquisa. Serão utilizados uma amostra de 3ml de sangue para as análises propostas.

O cronograma está adequado. Foi apresentado o orçamento da pesquisa. Foram descritos aspectos éticos no projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam todas as pendências e esclareceram todos os questionamentos feitos previamente.

Considera-se aprovado, salvo melhor juízo deste Comitê de Ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS nº. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para 30/03/2018.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ulg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.144.113

GOIANIA, 09 de Julho de 2015

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prp@ufg@gmail.com