

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de pós-graduação em Ciências Médicas**

**Maria Teresa Alves da Silva Rosa**

**Caracterização clínica de pacientes com deficiência intelectual  
sindrômica e alterações cromossômicas submicroscópicas detectadas  
pela análise cromossômica por microarray**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências Médicas pelo Programa de Pós-  
graduação em Ciências Médicas da  
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília  
2015

**Maria Teresa Alves da Silva Rosa**

**Caracterização clínica de pacientes com deficiência intelectual  
sindrômica e alterações cromossômicas submicroscópicas detectadas  
pela análise cromossômica por microarray**

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães  
Instituto de Ciências Biológicas - UnB

Dr. Jaime Moritz Brum  
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Profa. Dra. Rosangela Vieira de Andrade  
Universidade Católica de Brasília (suplente)

## **Figuras**

Figura 1. O papel da proteína FMRP no neurônio.....	19
Figura 2. Representação das espinhas dendríticas na síndrome do X-frágil.....	20
Figura 3. Representação do método de CGH array.....	25
Figura 4. Comparação do método de CGH array com o método de SNParray.....	27
Figura 5. Descrição das etapas para a realização da análise por microarray.....	38
Figura 6. Paciente1.....	45
Figura7. Imagem do array da paciente1(deleção 6p).....	46
Figura 8. Imagem do array da paciente 1 ( duplicação 0p).....	47
Figura 9. Paciente 2.....	47
Figura 10. Imagem do array da paciente 2 comparando com seu pai e sua mãe.....	48
Figura 11. Visão geral das microduplicações na região Xp11.22.....	50
Figura 12. Representação da região mínima do gene HWE1 que em dupla dose acarreta deficiência intelectual.....	51
Figura 13. Paciente 3.....	51
Figura 14. Imagem do array da paciente 3.....	52
Figura 15. Paciente 4.....	53
Figura 16. Imagem do array da paciente 4.....	54

Figura 17. Paciente 5.....	55
Figura 18. Imagem do array da paciente 5.....	56
Figura 19. Representação do gene ELK/ ERC.....	57
Figura 20. Paciente 6.....	58
Figura 21. Imagem do array da paciente 6.....	59
Figura 22. Paciente 7.....	60
Figura 23. Imagem do array do paciente 7.....	61
Figura 24. Paciente 8.....	62
Figura 25. Imagem do array do paciente 8.....	63
Figura 26. Paciente 9.....	64
Figura 27. Imagem do array do paciente 9.....	65
Figura 28. Paciente 10.....	66
Figura 29. Imagem do array do paciente 10.....	67
Figura 30. Paciente 11.....	68
Figura 31. Imagem do array do paciente 11.....	69
Figura 32. Paciente 12.....	70
Figura 33. Imagem do array do paciente 12, comparando com a mãe.....	71
Figura 34. Imagem do array do paciente 12, comparando com o pai.....	71
Figura 35. Paciente 13.....	72
Figura 36. Imagem do array do paciente 13.....	73
Figura 37. Paciente 14.....	74
Figura 38. Imagem do array do paciente 14(Dup 2p).....	75
Figura 39. Imagem do array do paciente 15 ( Dup 4q).....	75

Figura 40. Paciente 15.....	76
Figura 41. Imagem do array do paciente 15.....	77
Figura 42. Paciente 16.....	78
Figura 43. Imagem do array do paciente 16.....	79
Figura 44. Paciente 17.....	80
Figura 45. Imagem do array do paciente 17.....	81
Figura 46. Paciente 18.....	82
Figura 47. Imagem do array do paciente 18.....	83
Figura 48. Gráfico das características dos pacientes.....	84

## **Tabelas**

Tabela 1. Classificação do QI.....	15
Tabela 2. Classificação dos CNVs.....	24
Tabela 3. Estudos com microarray na última década.....	27
Tabela 3. Resultados.....	41

## Siglas

ACTB: *Beta-ActinCytoplasmic*

AGCC: *AffymetrixGeneChip® Command Console*

ANPM: *Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor*

AAMR: *American Association of Mental Retardation*

ASD: *AustismSpetrum Disorders*

BAC : *Bacterial Artificial Chromosomes*

BMPR1A: *Bone Morphogenetic Protein Receptor TypeIA*

CDG: *Congenital Disorders of Glicosilation*

CGH : *Comparative Genomic Hybridization*), oligoarrays

ChAS: *Affymetrix® Chromosome Analysis Suitev2.1*

CMA: *Chromossome Microarray Analysis*

CNV: *Copy Number Variation*

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

DD: *Development Delay*

DGV: *Database of GenomicVariants*

DI: *Deficiência Intelectual*

DF: *Dysmorphic features*

DNA: *deoxyribonucleic acid*

DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

EDTA: *Ethylene diamine tetraacetic acid*

EFI4E :*Eukaryotic Translation Iniciation Factor*

EIM: *Erros Inatos do Metabolism*

ECARUCA : *European Cytogeneticists Association Register*

FMR1: *Fragile X Mental Retardation Protein*

FMRP: *Fragile X Mental Retardation Protein*

FOXC1 :*ForkheadBox C1*

FOXN1 :*Forkhead-class transcription factor*

FSCN1: *Fascin Actin-Bundling Protein 1*

HUWE1: HCECT, UBA e WWE

ID: *Intellectual Disability*

IMMP2L: *Inner Mitochondrial Membrane Protease-like 2*

ISCN: *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

MCA: *Multiple Congenital Anomalies*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NDP: *Norrie Disease Gene*

NLGN4 : *Neuroigin 4*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAX6 : *Paired Box Gene 6*

PCR: *Polymerase Chain*

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

PTPRC: *Protein-Tyrosine Phosphatase Receptor-Type C Reaction*

SCID: *síndrome da imunodeficiência combinada*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SHOX: *Short Stature Homeobox*

SMEK2 : *MEK1 Supressor 2*

VOUS : *Variants of Uncertain Clinical Significance*

WT1 : *Wilms tumor 1*

WAGR: *Wilms Tumor, Aniridia, Genitourinary Anomalies and Mental Retardation Syndrome*



## Sumário

### Resumo

### Abstrat

<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>2. Justificativa</b> .....	31
<b>3. Objetivos</b> .....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
<b>4. Métodos</b> .....	33
4.1 População de estudo.....	33
4.2 Termo de consentimento.....	34
4.3 Avaliação clínica e coleta.....	34
4.4 Extração do DNA.....	34
4.5 Análise por microarray.....	35
<b>5. Resultados e discussão</b> .....	40
<b>6. Conclusão</b> .....	88
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	89

### Anexos

Anexo I .....	100
Anexo II.....	101

## Agradecimentos

Primeiramente à minha orientadora Juliana Forte Mazzeu, uma pessoa incrível, que além de muito inteligente e competente, é muito humana e compreensiva. Sem a sua experiência e orientação eficiente esse trabalho não seria possível.

À Dra Íris Ferrari, que podemos afirmar que é a mãe da genética médica no Brasil, responsável pela formação de vários médicos geneticistas e biólogos especializados em genética, em torno da qual todos orbitam em busca de um pouco do seu conhecimento e sabedoria.

À Dra Mara Córdoba e Heloísa Safatle, minhas companheiras de ambulatório, que me acolheram no serviço de genética médica do HUB e me ajudaram na escolha e na caracterização dos pacientes a serem abordados nessa tese.

À todos do laboratório de genética da UnB, incluindo Aloísio, Pollyana, Naiara, Nilza e outros, que sempre foram muito solícitos e me ajudaram muito.

Ao Claudiner Oliveira Pereira, biólogo muito capacitado e prestativo que realizou o array dos pacientes da minha amostra.

À Dra Teresinha Cardoso, minha primeira inspiração para fazer genética médica, excelente médica, geneticista e pessoa, que me estimula a cada dia a buscar mais conhecimento e a ser uma pessoa e profissional melhor.

A todos do Núcleo de Genética Médica do Hospital de Apoio, meus colegas de trabalho, principalmente por agüentarem meu estresse exacerbado durante a realização desse trabalho, especialmente à Ruscaia Dias Teixeira, sempre disposta a ajudar, que me auxiliou na formatação da dissertação.

À minha família, meu pai, Benedito Vieira Rosa, minha mãe, Lindalva Alves da Silva Rosa, meus irmãos, Larissa Alves da Silva Rosa e Pedro Henrique Alves da Silva Rosa, que são minha base e meu alicerce, que sempre me compreendem, me apoiam e me ajudam no que é necessário.

À todos, muito obrigada

“Ter desafios é o que faz a vida interessante e superá-los é o que faz a vida ter sentido”.

Joshua J. Marine

## Resumo

A deficiência intelectual/atraso de desenvolvimento neuropsicomotor é caracterizada por comprometimento da função cognitiva e déficit em duas ou mais funções adaptativas e afeta cerca de 3% da população mundial, sendo um problema importante de saúde pública. Há várias causas para a deficiência intelectual e as causas genéticas contribuem com uma porcentagem significativa desses casos. A habilidade da análise cromossômica por microarray (CMA) em detectar alterações submicroscópicas tem revolucionado o diagnóstico clínico dos pacientes com deficiência intelectual, distúrbio de comportamento e malformações congênitas. O reconhecimento das variações do número de cópias (*copy number variations*- CNVs) nesses indivíduos permite um melhor acompanhamento, aconselhamento genético e intervenção terapêutica em alguns casos. O objetivo desse estudo foi descrever as características fenotípicas de pacientes com deficiência intelectual e dismorfias, que apresentam alterações submicroscópicas. Dos 50 pacientes analisados, 36% tiveram CNVs identificados. Desses pacientes, 22% tiveram CNVs patogênicos relacionados com o quadro clínico apresentado e 12% tiveram CNVs de significado incerto (*variants of unknown significance* - VOUS). Em um paciente os CNVs foram herdados de pais fenotipicamente normais e consideradas possivelmente benignas. Dentre as características fenotípicas apresentadas por esses pacientes, as alterações em mãos e membros são as mais prevalentes, encontradas 20% dos pacientes, seguida pelas alterações oftalmológicas observadas 14%. Esse estudo reforça a importância da realização da análise cromossômica por microarray como método diagnóstico em pacientes com deficiência intelectual e dismorfias, contribuindo com a descrição de alterações cromossômicas raras ou não previamente descritas na literatura.

Palavras-chaves: deficiência intelectual, CMA, CNVs, dismorfias, malformações congênitas.

## **Abstract**

Intellectual disability/developmental delay is characterized by significantly impaired cognitive functioning and deficit in two or more adaptive behaviors. It affects about 3% of the world's population and is a major public health problem. There are many causes of intellectual disability and genetic causes contribute to a significant percentage of cases. The ability of chromosome microarray analysis (CMA) to detect submicroscopic genetic abnormalities has revolutionized the clinical diagnostic approaches to individuals with intellectual disability, neurobehavioral phenotypes and congenital malformations. The identification of copy number variations in these patients may allow a better follow-up, genetic counseling and therapeutic interventions in some cases. The aim of this study was to describe the phenotypic characteristics of patients with intellectual disability and dysmorphisms carrying submicroscopic chromosome abnormalities. In our 50 patient cohort, 36% had non-polymorphic CNVs. Among the patients, 22% had pathogenic CNVs related to the phenotype and 12% had variants of unknown significance (VOUS). In one patient CNVs were inherited from healthy parents and were considered to be benign. Among clinical signs present by these patients, hands and feet malformations are the most prevalent, found 20%, followed by ophthalmological abnormalities in 14%. This study reinforces the importance of performing chromosome microarray analysis as a diagnostic tool for patients with intellectual disability and dysmorphisms, contributing to the description of rare and novel chromosome abnormalities.

**Keywords:** Intellectual disability, CMA, CNV, dysmorphisms, congenital malformations.

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) e ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) é um dos maiores problemas sociais em todos os países do mundo (Srivastava,2014). O conceito de deficiência intelectual passou no decorrer dos anos por diversas definições e terminologias: oligofrenia, retardo mental, atraso mental, deficiência mental, etc. Na década de 80 o termo mais usado era deficiência mental, mas atualmente é uma tendência mundial, inclusive no Brasil, de se usar o termo deficiência intelectual. Existem algumas razões para considerar o termo deficiência intelectual como mais adequado. Primeiramente, é mais apropriado usar o termo intelectual para se referir às desordens do intelecto especificamente e não como se referindo ao funcionamento da mente como um todo. Outra razão é que deve-se fazer a distinção entre deficiência mental e desordens mentais. O termo retardo mental caiu em desuso por ser considerado pejorativo e estigmatizante. Um termo que atualmente também é utilizado como sinônimo de deficiência intelectual é déficit cognitivo.

A deficiência intelectual abrange um vasto complexo de quadros clínicos, produtos de diversas etiologias e que se caracteriza pelo desenvolvimento intelectual insuficiente, em termos globais ou específicos. Segundo a Associação Americana de Deficiência Mental (AAMR) e o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), Deficiência Intelectual é o estado de redução notável do funcionamento intelectual, significativamente abaixo da média, oriundo no período de desenvolvimento, e associado a limitações de pelo menos dois aspectos do funcionamento adaptativo ou da capacidade do indivíduo em responder adequadamente às demandas da sociedade em comunicação, autocuidados, competências domésticas, habilidades sociais/ interpessoais, auto-orientação, utilização dos recursos comunitários, autonomia, rendimento escolar, saúde, segurança, lazer e trabalho (De Vries, 2005). A maioria das pessoas com DI é identificada na primeira infância com base nos consensos de atraso de desenvolvimento que pode ser motor,

cognitivo e da fala (Mefford, 2012; De Ligt, 2012 ).A DI também pode ser caracterizada por uma escala de quociente de inteligência (QI) inferior a 70. A utilização dos testes de QI que medem o grau da inteligência por meio do cálculo da divisão da idade mental (avaliada por testes específicos) pela idade cronológica, multiplicada por 100, permite identificar os indivíduos com deficiência intelectual(Tabela 1).

**Tabela 1. Classificação do QI. QI abaixo de 70 é um indicador de deficiência intelectual.**

QI	Classificação
> 130	Muito Superior
120-129	Superior
110-119	Médio Superior
90-109	Média
80-89	Médio Inferior
70-79	Limítrofe
<69	Muito rebaixado

A DI pode ocorrer como um fenômeno isolado ou acompanhado de malformações e sinais neurológicos, convulsões ou distúrbio de comportamento (Srivastava, 2014). A etiologia pode ser genética ou adquirida. Nos países subdesenvolvidos, as causas genéticas são pouco conhecidas e fatores ambientais como desnutrição, infecções, asfixia neonatal, privação cultural, saúde precária desempenham um papel importante na ocorrência do atraso de desenvolvimento e déficit cognitivo. (Durkin, 2002; Ropers, 2010; Jauahi, 2011). Mas a etiologia genética não pode ser ignorada (Uwienza, 2014). No Brasil, com a melhoria das condições de saúde e sanitárias, as causas ambientais que contribuem para o atraso de desenvolvimento e déficit cognitivo estão sendo controladas, sendo cada vez mais importante a descoberta da etiologia genética da DI.

As causas genéticas de DI são variadas. Mutações gênicas, duplicações ou deleções podem estar associadas. Muito tempo e esforço estão sendo feitos

por múltiplos grupos pelo mundo para identificar genes específicos causadores da DI. Como resultado desses esforços, pelo menos 400 genes foram encontrados e relacionados a déficit cognitivo e é provável que esse número represente uma proporção mínima dos genes envolvidos. (Van Bokhoven, 2011).

As mutações genéticas e outros fatores primários causam direta e indiretamente disrupção metabólica, neurodesenvolvimento alterado e interferência na proliferação ou migração celular, ocasionando anormalidades cerebrais, que resultam em distúrbios cognitivos e comportamentais. É possível que alguns grupos comuns de genes, proteínas e metabólitos ou uma combinação destes estejam alterados na maioria dos pacientes com déficit cognitivo. Componentes de uma rede comum de interação e processos biológicos associados a estes genes/proteínas são críticos para funções cognitivas e comportamentais normais. (Srivastava, 2014).

A categorização funcional das proteínas codificadas pela maioria dos genes associados a DI é importante, não só para entender os mecanismos fisiopatológicos moleculares e celulares, como para definir o potencial patogênico de novos genes candidatos a causar déficit cognitivo quando mutados.

Um número significativo de proteínas codificadas por genes associados à DI participam das sinapses e afetam direta ou indiretamente a estrutura e função dos neurônios, mais especificamente dos dendritos e sinapses. A maioria das proteínas relacionadas a DI são vistas em abundância nos compartimentos pré e pós-sinápticos e afetam tanto estruturas dendríticas quanto espinhais e alteram seu número e morfologia estando assim relacionadas ao controle de estruturas neuronais e conectividade. (Humeau, 2009). Os neurônios são as unidades condutoras de sinais do sistema nervoso e apresentam vários dendritos curtos, que são arborizados e recebem sinais de outros neurônios e um único axônio longo que transmite os sinais adiante (Kandel, 2000). As espinhas dendríticas são elementos diminutos localizados em locais pós-sinápticos das sinapses excitatórias como locais de contato entre axônios e dendritos (Chechlac, 2003). As alterações na forma e no número



das espinhas dendríticas são a base anatômica do aprendizado e memória. Muitas classes de moléculas participam de vários processos celulares que regulam a morfologia neuronal e comunicação, sendo críticas para as funções cognitiva e comportamental normais (Srivastava, 2014).

A disfunção sináptica (formação e plasticidade) e dendrítica parecem ser os principais fatores que contribuem para a DI. Análise de tecidos cerebrais pós-morte frequentemente mostram espinhas dendríticas com formato e densidade alteradas.

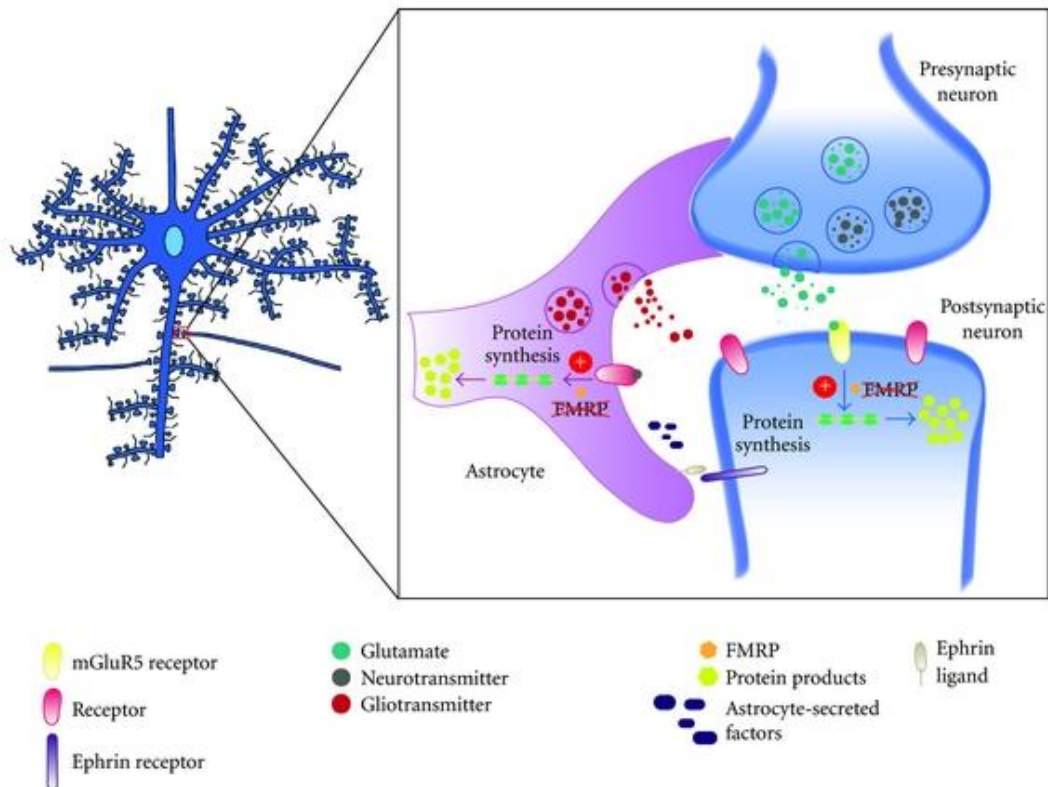
A plasticidade abrange as capacidades do cérebro de ser moldado pela experiência, de aprender e recordar e de reorganizar-se e recuperar após uma lesão. A plasticidade se desenvolve a partir da interação das vias excitatórias e inibitórias atuantes nas sinapses com um predomínio das primeiras, que utilizam o neurotransmissor glutamato.

O aprendizado e memória envolvem alterações a longo prazo na estrutura das sinapses. A transcrição de genes é a via comum final para o registro das memórias a longo prazo e para a construção de circuitos neuronais maduros no cérebro em desenvolvimento (Johnston, 2003). Assim, o mecanismo de plasticidade envolve a estimulação por neurotransmissores de receptores na superfície celular, a ativação de cascatas de sinalização intracelular, a transcrição de genes e a síntese de proteínas novas que modificam a forma física e o número das sinapses (Vasconcelos, 2004).

Muitas mutações com perda de função ou com aumento da dosagem gênica encontradas no cromossomo X produzem deficiência intelectual. Mutações no cromossomo X podem explicar cerca de 10 % das deficiências intelectuais (Michelson, 2011). As proteínas codificadas por esses genes participam das vias de sinalização que regulam a morfologia das espinhas dendríticas; da liberação de neurotransmissores; do crescimento dos axônios e do citoesqueleto de actina (Chechlac, 2003). As numerosas mutações relacionadas à deficiência intelectual em genes mapeados no cromossomo X explicam o fato da freqüência da DI ser maior em homens que em mulheres (Vasconcelos, 2004)

Estudos dos neurônios piramidais no córtex cerebral e hipocampo de pacientes com as síndromes de Down, Rett e X-frágil confirmaram a presença de anormalidades bioquímicas que levam alteração na forma e ramificação das espinhas dendríticas ( Kauffmann, 2004) (Figuras 1 e 2).

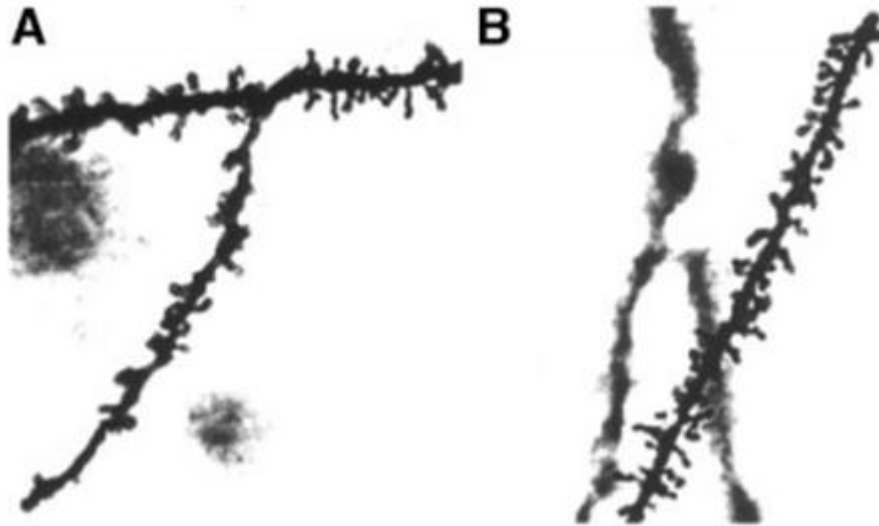
A síndrome do X-frágil é uma causa hereditária comum de deficiência intelectual (Jin , 2003). A síndrome está associada à expansão da repetição de trinucleotídeos CGG presentes no gene *FMR1*, situado no locus Xq27.3 (Willemsen, 2000).O gene *FMR1* codifica a proteína FMRP, que se liga ao RNAm e sua ação reguladora da transcrição-tradução é importante na maturação e função das sinapses (Ritney, 2003; Branchi, 2003; Johnston, 2003) (Figura 1). Em indivíduos normais, as repetições CGG possuem 6-54 unidades, enquanto aqueles com a síndrome exibem uma expansão acima de 200 unidades, constituindo a mutação completa. Um número de repetições CGG maior que 200 resulta na hipermetilação do gene, silenciando sua transcrição e resultando na ausência da proteína FMRP.



**Figura 1.** A deficiência da proteína FMRP nos neurônios, interferindo na produção de proteínas pré e pós-sinápticas necessárias para o adequado neurodesenvolvimento. (Adaptado de *Fragile X Syndrome*, 2014)

Os indivíduos com 55 a 200 repetições são considerados portadores da pré-mutação, a qual é instável e tende a expandir-se durante a primeira divisão meiótica feminina (Tassone, 2000). Camundongos que tiveram o gene *FMR1* nocauteado apresentaram macrorquidia e déficit de aprendizado e da memória, simulando o fenótipo humano (Dutch-Belgian, 1994).

Estudos histopatológicos em pacientes com a síndrome do X-frágil e em camundongos modificados geneticamente observaram espinhas dendríticas anormais, fortalecendo o conceito de que a disgenesia das espinhas dendríticas está associada à deficiência intelectual (Jin, 2003).



**Figura 2.** Comparação das espinhas dendríticas em camundongos sem X-frágil e com X-frágil A) espinhas dendríticas normais. B) espinhas dendríticas em ratos nocaute com X-frágil. Adaptado de *Atlas of the Developing Rat Nervous System* .

Outra importante causa de DI são os erros inatos do metabolismo (EIM), que são um conjunto de desordens do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios causadas por disfunção enzimática. A maioria dos erros inatos do metabolismo têm herança autossômica recessiva. Deve-se suspeitar de erros inatos do metabolismo em crianças cujos pais são consangüíneos ou tiveram outros filhos com problemas similares ou morte inexplicadas pré ou pós-natal (Michelson, 2011). Crianças com erros inatos do metabolismo podem ter múltiplas disfunções sistêmicas, falha no desenvolvimento, recusa alimentar, odor incomum, perda auditiva, convulsões ou encefalopatias. Alguns erros inatos como as doenças de depósito ou de acúmulo de macromoléculas (CDG, mucopolissaridoses, etc) cursam com visceromegalias e distorções características. O diagnóstico é feito principalmente por meio de exames bioquímicos (dosagem de amônia, lactato, aminoácidos plasmáticos, acilcarnitinas, ácidos orgânicos urinários, mucopolissacarídeos, etc).

A triagem para EIM abrange cerca de 5% dos diagnósticos de crianças com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual, dependendo da presença de indicadores clínicos e da performance dos testes diagnósticos. É importante considerar os erros inatos entre as causas de

deficiência intelectual porque alguns tipos específicos podem ser tratados, com melhora dos sintomas neurológicos, como no caso da fenilcetonúria (Michelson, 2011).

A deficiência intelectual é importante do ponto de vista da saúde pública, uma vez que afeta aproximadamente 3% da população, independente da etnia. Entender a etiologia da deficiência intelectual é muito importante para permitir a determinação do risco de recorrência, a correlação com outras comorbidades e a compreensão dos processos fisiopatológicos celulares e moleculares possibilitando potenciais avanços terapêuticos (Srivastava, 2014).

O diagnóstico de DI é dificultado pela complexidade de sua etiologia. Cerca de 50% dos afetados permanece sem diagnóstico, mesmo após exaustivas pesquisas clínicas, laboratoriais e genéticas. A DI pode ocorrer de forma isolada ou associada à presença de malformações/ dismorfias, sendo referida, nesse caso, como deficiência intelectual sindrômica. Alguns estudos apontam que o risco de DI é maior em crianças com defeitos estruturais congênitos (Decouflé, 2001; Jelliffe, 2003).

A maior disponibilidade de técnicas laboratoriais na investigação das causas genéticas da DI vem garantindo a possibilidade de se estabelecer novos diagnósticos etiológicos. Aberrações cromossômicas de número ou estrutura (translocações, deleções, duplicações) são uma causa comum de anomalias múltiplas que incluem defeitos de crescimento, atraso de desenvolvimento e dismorfias. As anormalidades cromossômicas, detectadas pelo cariótipo, são responsáveis por 5% das deficiências intelectuais, entre elas, a síndrome de Down representa a maior parcela, correspondendo a 17% dos casos.

Desde a descoberta da trissomia do 21, a causa da síndrome de Down, houve avanços progressivos nos métodos citogenéticos e moleculares para identificar causas genéticas e epigenéticas de anormalidades fenotípicas. O cariótipo com bandeamento G é o exame citogenético inicial indicado para pacientes com suspeita de alterações cromossômicas. Inicialmente as análises cromossômicas se limitavam à contagem do número e forma dos cromossomos. Mais tarde várias formas de bandeamento incluindo análise

cromossômica com bandeamento Giemsa (bandeamento G) e técnicas de alta resolução em cromossomos em prometáfase permitiu a diferenciação de 700-850 bandas por genoma haplóide de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Bayani, 2004). Dependendo da resolução do bandeamento e das características da região, deleções e duplicações de no mínimo 5-10 megabases podem ser identificadas.

O uso de metodologias mais recentes evidenciaram que 10% a 25% dos casos de deficiência intelectual envolvem rearranjos muito pequenos, não detectáveis pelo cariótipo. (Linhares, 2012). As consequências clínicas de um rearranjo cromossômico estão geralmente relacionados com a localização desse rearranjo, seu tamanho, a quantidade de genes envolvidos e sua função (Tejada, 2006).

As variações de número de cópias, que são desequilíbrios cromossômicos como deleções e duplicações, são frequentemente detectadas em um amplo espectro de desordens mentais (Iourov, 2012). Os CNVs (*Copy Number Variations*) além de serem provavelmente a causa mais comum de desordens do desenvolvimento incluindo DI, esquizofrenia, autismo e anomalias congênitas constituem importante fonte de variação genética na população geral, (Marshall, 2012).

Em 2004 começaram a surgir técnicas de análise cromossômica por microarray- CMA (*Chromosome Microarray Analysis*) que possibilitaram um rastreamento de todo o genoma para CNVs, aumentando o número de diagnósticos de anormalidades genéticas em pacientes com deficiência intelectual com cariótipo normal (Christian, 2011).

As técnicas de CMA permitem verificar se há perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos no genoma de um indivíduo, detectando alterações cromossômicas 10 a 100 vezes menores do que é visível pelo microscópio óptico, dependendo da plataforma utilizada. Assim, o CMA é uma ferramenta poderosa para detectar desequilíbrios cromossômicos pequenos aprimorando a investigação de anormalidades submicroscópicas que as técnicas citogenéticas convencionais não identificam, sendo responsável por detectar alterações em 15-24% das DIs consideradas como idiopáticas.

O significado clínico do CNV é usualmente determinado pela observação da segregação do fenótipo na família, da associação com um fenótipo reconhecido ou do tamanho da variante (grande a ponto de ser pouco provável não ter consequências fenotípicas (Sagoo, 2009). A comparação com dados obtidos do estudo de indivíduos não afetados permite distinguir os CNVs comuns (provavelmente benignos) dos CNVs raros (possivelmente patogênicos). As informações da frequência de CNVs em indivíduos afetados e controles não-afetados podem ser encontradas em banco de dados públicos (DGV, ECARUCA, DECIPHER, OMIM, etc.) (Hehir-Kwa, 2013). Em geral os CNVs são classificados como patogênicos quando incluem regiões de síndromes bem conhecidas, variações “de novo” levando à haploinsuficiência de genes ou alterações cromossômicas maiores que 5MB; potencialmente patogênicos quando não são reportados previamente; variantes de significado incerto (VOUS) quando são herdados de pais normais mas contendo genes de função conhecida; e potencialmente benignos quando herdados dos pais e não relacionados com o fenótipo apresentado (Bartnik, 2014). Geralmente os CNVs podem ser considerados como benignos quando CNVs similares podem ser encontrados em mais de 1% de controles não afetados. Na tabela 2 são descritos alguns critérios para considerar os CNVs como patogênicos ou benignos.

Tabela2. Classificação dos CNVs. Tabela adaptada do Miller et al. The American Journal of Human genetics, 2010.

Critérios	Patogênico	Benigno
CNV herdado de um genitor saudável		✓
CNV herdado de um dos genitores, alterado ou expandido	✓	
CNV herdado de um genitor afetado	✓	
Similar a um CNV de um parente saudável		✓
Similar a um CNV de um parente afetado	✓	
CNV relatado em pacientes saudáveis		✓
CNV relacionado a síndromes já conhecidas	✓	
CNV relacionado a genes do OMIM associados a comorbidades	✓	
CNV rico em genes	✓	
CNV pobre em genes		✓

O rastreamento de alta resolução usando CMA não somente detecta desequilíbrios submicroscópicos como também permite delinear com precisão os segmentos envolvidos nas duplicações e deleções. Isto é crucial para a avaliação genótipo-fenótipo e identificação de genes candidatos envolvidos em deficiência cognitiva e dismorfias (Smith, 2004; Schoumans, 2005).

O CMA tem revolucionado os testes citogenéticos realizados em pacientes com deficiência cognitiva, dismorfias e anomalias congênitas múltiplas. Está sendo cada vez mais usado rotineiramente em pacientes com DI em adição às técnicas citogenéticas quando apresentam resultados negativos. Dentre as vantagens em relação às técnicas convencionais destaca-se a rápida análise genômica em alta resolução, identificando variação de número de cópias (CNVs) em todos os cromossomos, incluindo regiões



subteloméricas e contribuindo para o mapeamento genômico dessas alterações (Slavotinek, 2008; Sagoo, 2009). As análises por microarray podem possibilitar a detecção de síndromes já conhecidas como síndrome de Williams e Velocardiofacial, assim como de outras desordens não descritas previamente (Michelson, 2011).

O termo análise cromossômica por *microarray* inclui diversos métodos de detecção de alterações submicroscópicas baseadas em *array*, dentre elas a hibridação genômica comparativa-CGH (*Comparative Genomic Hybridization*), *oligoarrays* e *SNParrays* (*Single Nucleotide Polymorphism arrays*). A primeira técnica de CMA que surgiu como possibilidade de detectar deleções e duplicações como causa de deficiência intelectual e malformações congênitas foi o CGH. No CGH *array*, dois DNAs são marcados com fluorocromos diferentes (usualmente vermelho e verde) e cohibridizados com um *array* único para obter comparação direta do número de cópias entre o teste e a amostra controle (Figura 3).

As plataformas de CGH *array* mais antigas utilizavam sondas correspondentes a cromossomos de bactérias artificiais - BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) com uma resolução típica de 1MB. Posteriormente, foi implantado o CGH com sondas de oligonucleotídeos sintéticos, com maior poder de resolução de até 30kb (*oligoarrays*).

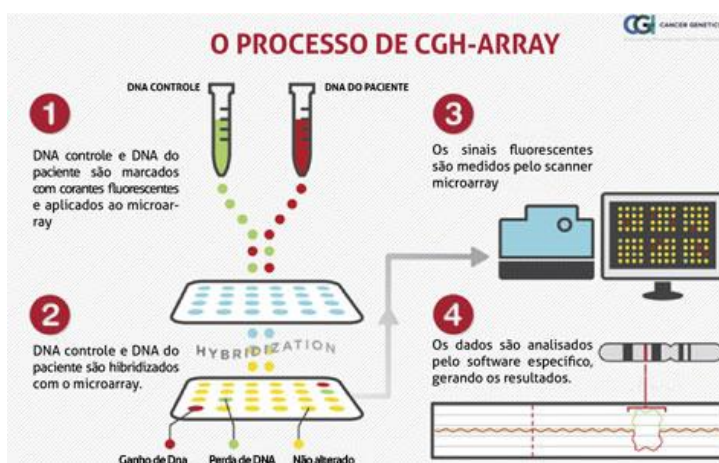


Figura 3. Descrição do método de CGH *array* em que o DNA controle e do paciente são marcados com corantes fluorescentes e hibridizados com as sondas de *microarray* possibilitando detectar perdas ou ganhos de material cromossômico na região analisada, que posteriormente são

interpretadas por *software* específico. Adaptada de material de divulgação do Laboratório Hermes Pardini.

O CGH *array* possibilita a determinação precisa do número de cópias pela comparação virtual de um controle interno hibridizado com o mesmo *array* e pelo uso de oligonucleotídeos mais longos correspondentes a segmentos dispersos por todo o genoma.

Plataformas contendo oligonucleotídeos como sondas (*oligoarrays*) podem ser do tipo CGH, como descrito acima, ou podem se utilizar da hibridação de uma única amostra por *chip* e comparação do resultado individual da amostra testada com um banco de dados de indivíduos normais.

Apesar das vantagens dos *oligoarrays*, eles não podem detectar diferenças associadas à perda de heterozigose que ocorre em tumores, nas consanguinidades e dissomias uniparentais. Essas alterações podem ser detectadas pela técnica de *SNParray* (*Single Nucleotide Polymorphism array*).

Na técnica de *SNParray*, somente um único DNA teste é marcado e hibridizado com o *array* para comparação com banco de dados de controles. (Figura 4). Os *SNParrays* são limitados pela distribuição de SNPs no genoma e pelo uso de oligonucleotídeos menores. Sequências altamente homólogas como pseudogenes não podem ser distinguidas e genotipadas.

As plataformas mais recentes de *oligoarrays*, sejam do tipo CGH ou não comparativa têm associado sondas de oligonucleotídeos não-polimórficos a SNPs permitindo a detecção, assim, não apenas de CNVs mas também de perdas de heterozigose (Figura 4).

Após uma década de estudos de CMA, é importante notar a alta taxa de detecção de alterações que se reflete numa melhor resolutividade diagnóstica e a descrição de muitos CNVs que nunca tinham sido observados ou descritos antes, mostrando a grande quantidade de variações genéticas particulares presentes na população (Hehir-Kwa, 2010).

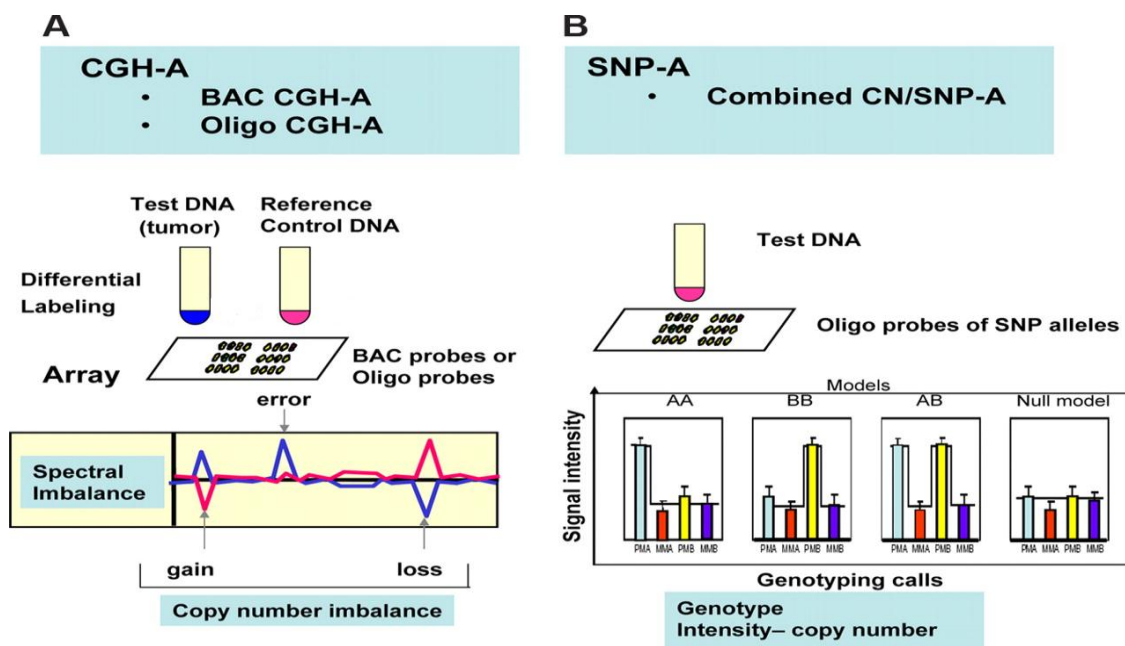


Figura 4. Comparação entre a técnica de CGH *array* e SNP *array*, A) Na técnica de CGH *array* é utilizado um DNA controle que é hibridizado com o DNA do paciente na plataforma contendo as sondas do *array*. B) Na técnica de SNP *array* o DNA do paciente é amplificado e marcado e hibridizado com as sondas, na plataforma de *array*, que corresponde aos alelos de cada *locus*, permitindo a determinação de heterozigose e homozigose em cada *locus*. A intensidade de sinal da hibridização permite identificar número de cópias. Adaptada do Blood Journal, 2008.

Em 2010, Miller et al, fizeram uma meta-análise de 33 estudos que utilizaram técnicas de CMA, incluindo 21698 pacientes com deficiência intelectual, autismo e malformações, inferindo que o CMA aumenta a possibilidade diagnóstica de 15-20% (Tabela 3).

**Tabela 3. Comparação de estudos de análise cromossômica por *microarray*, levando em consideração resolução, número de pacientes analisados, fenótipo, tipo de *array* e porcentagem de diagnósticos. Adaptada de Miller, 2010 com atualizações.**

<b>Autor (ano)</b>	<b>Localidade</b>	<b>Resolução</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Tipo de Array</b>	<b>Diagnósticos (%)</b>
Viesses et al (2003)	Holanda e Reino Unido	1 Mb	20	ID/DF	BAC	10,0
Shaw-Smith et al (2004)	França e Reino Unido	1 Mb	50	ID	BAC	14.0
De Vries et al (2005)	Holanda	50 Kb	100	ID	BAC	10.0
Schoumans et al (2005)	Suécia	1 MB	41	ID	BAC	9.8
Tyson et al (2005)	Canadá	1.3	22	ID/DF	BAC	13.7
Wong et al (2005)	Estados Unidos	telômero	102	ID	BAC	18.6
Ballifet al (2006)	Estados Unidos	telômero	3600	ID/DD	BAC	5.1
Friedman et al (2006)	Canada	30Kb	100	ID	SNPOligo (Affy 100k)	11
Krepischi-Santos et al (2006)	Brasil	1 MB	95	ID/DF/MCA	BAC	16.8
Menten et al (2006)	Bélgica	1 MB	140	ID/MCA	BAC	13.6
Miyake et al (2006)	Japão	1.4 MB	30	ID/MCA	BAC	16.7
Rosenberg et al (2006)	Holanda, Brasil, Reino Unido	1 MB	81	ID/DF	BAC	16
Sharp et al (2006)	Reino Unido e Estados Unidos	Targeted	290	ID	BAC	5.5
Aradhya et al (2007)	Estados Unidos	35 Kb	20	ID/DF/MCA	BAC	35.0

Baris et al (2007)	Estados Unidos	1 MB	234	ID/DF/MCA	BAC	5.6
Engels et al (2007)	Alemanha	5.0 MB	60	ID	BAC	10.0
Fan et al (2007)	Estados Unidos	30-35 MB	100	ID/DD	Oligo (Agilent 44K)	15.0
Lu et al (2007)	Estados Unidos	Targeted	2513	ID/DD/DF/MCA/A SD	BAC	7.0
Newman et al (2007)	Estados Unidos	1 MB	36	DD/LD/DF	BAC	13.8
Shaffer et al (2007)	Estados Unidos	Targeted	8789	ID/DD/MCA	BAC	6.9
Shen et al (2007)	Estados Unidos	35 kb	211	ID/DD/MCA	Oligo (Agilent)	7.6
Thuresson et al (2007)	Suécia	1 MB	48	ID/DF/MCA	BAC	6.3
Wagenstaller et al (2007)	Alemanha	23.6 KB	67	ID	SNP Oligo (Affy 100k)	16.4
Aston et al (2008)	Estados Unidos	1.3 MB	1075	ID/DD/DF/MCA	BAC	5.3
Baldwin et al (2008)	Estados Unidos	75 KB	211	ID/DD/DF/MCA/A SD	Oligo (custom) Agilent 44K	15.6
Pickering et al (2008)	Estados Unidos	1 MB	1176	ID/DD	BAC	7.8
Shevell et al (2008)	Canada	Targeted	94	ID/DD	BAC	6.4
Xiang et al (2008)	Estados Unidos	35 KB	50	ID/DD	Oligo (Agilent44k)	18
Nowakowsa et al (2008)	Estados Unidos	Targeted	91	ID/DF	BAC	11.8
Lu et al (2008)	Estados Unidos	Targeted	638	MCA	BAC	17.1

Shaw-Smith et al (2013)	França e Reino Unido	1 MB	50	ID/DF	Oligo (Agilent)	24.0
Iourov et al (2012)	Rússia	300 KB	54	ID/ASD/DF	BAC	30
Shoumans et al (2013)	Suécia	1 MB	41	ID/DF	BAC	9.7
Bartnik et al (2013)	Polônia	30 Kb	256	ID	Oligo (Agilent) 180k	16.0
Uwineza et al (2014)	Ruanda	900 KB-34 MB	50	DD/ID/MCA	Oligo (Agilent 180k)	26

---

ASD: Autism Spectrum Disorders ; DD: Developmental Delay ;DF: Dysmorphic Features ; ID: Intellectual Disability ; MCA: Multiple Congenital Anomalies

A heterogeneidade dos diagnósticos por *microarray* observada nos estudos pode ser atribuída aos tamanhos das amostras e às diferentes plataformas de *array*. A análise da resolução do *array* sugere que resoluções menores do que 1Mb levam à uma maior acurácia diagnóstica. Um fato curioso é que estudos com amostras menores têm resultados mais significativos que estudos com amostras maiores. Uma explicação para isso é o que estudos mais amplos envolvem pacientes com deficiência intelectual e anormalidades congênicas mais leves. Pacientes com alterações clínicas mais significativas têm mais chances de apresentarem alteração no *array*.

É nítido o progresso do conhecimento médico e científico acerca dos rearranjos cromossômicos permitindo melhorar os cuidados médicos e o aconselhamento genético para as famílias afetadas, além de facilitar o conhecimento acerca de genes que afetam o desenvolvimento e a saúde humana. Além disso, é preciso testar os genitores dos indivíduos afetados sempre que possível, para determinar se as alterações genéticas foram herdadas ou se surgiram “*de novo*”.

Com as informações sobre os genitores os diagnósticos genéticos podem ajudar a aperfeiçoar o suporte clínico identificando e melhorando a informação sobre síndromes conhecidas e genes envolvidos. Se as alterações forem detectadas no(s) genitor(es), é necessário tentar averiguar se ele(s) possui(em) alguma alteração fenotípica similar a dos indivíduos afetados.

## 2. JUSTIFICATIVA

As doenças genéticas constituem um grupo de doenças de difícil diagnóstico e que requerem exame clínico detalhado feito por geneticista clínico experiente e exames especializados para identificação de sua etiologia. O emprego de técnicas de citogenética molecular como CMA para caracterizar rearranjos cromossômicos submicroscópicos tem revelado ser importante para a identificação da etiologia de quadros sindrômicos de origem genética e aconselhamento genético aos pacientes.

Pacientes com deficiência intelectual/atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, características dismórficas e múltiplas malformações podem se beneficiar das informações dadas pela análise por *microarray*, possibilitando o diagnóstico de problemas tratáveis, o que pode ajudar a orientar ações clínicas específicas e melhorar o cuidado com o paciente.

As técnicas previamente descritas, embora de difícil acesso, são realizadas em laboratórios de referência e de pesquisa no Brasil. Cabe ao médico, especialmente ao geneticista clínico, conhecê-las o suficiente para requisitar os exames mais adequados a seu paciente e saber interpretar seus resultados. Estabelecer a causa da deficiência intelectual é importante, tanto para o manejo clínico como para o aconselhamento genético dos pacientes e famílias afetadas.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as principais alterações fenotípicas encontradas em pacientes com alterações cromossômicas detectadas pela análise cromossômica por *microarray*

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar a análise cromossômica por *microarray* em uma amostra de pacientes sindrômicos com deficiência intelectual ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor.

3.2.2 Descrever os quadros clínicos de pacientes com alterações submicroscópicas, comparando com os achados da literatura e identificando as principais alterações fenotípicas observadas.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo 50 pacientes encaminhados ao ambulatório de genética do Hospital Universitário de Brasília por apresentarem atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual e desvios fenotípicos, avaliados no período de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2014, sem diagnóstico clínico de síndrome genética definida, que tiveram resultado de cariótipo normal e que aceitaram participar da pesquisa.

#### **Critérios de inclusão**

Pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou deficiência intelectual e com malformações/ dismorfias associadas que apresentavam resultado de cariótipo normal.

#### **Critérios de exclusão**

Pacientes que apresentavam alteração em cariótipo ou outros exames moleculares como pesquisa de X-frágil e MLPA. Pacientes com características compatíveis com síndromes gênicas conhecidas

#### **Critério diagnóstico para alteração não patogênica**

CNVs herdados de pais não-afetados fenotipicamente e não relatados na literatura como tendo relação com o quadro clínico do paciente. CNVs conhecidos como benignos pelos bancos de dados disponíveis.

#### **Critério diagnóstico para alteração possivelmente patogênica**

CNVs não herdados e que apresentam relação com o quadro clínico do paciente de acordo com a literatura.

#### **Critério diagnóstico para normal:**

Pacientes que não tiveram alteração na análise por *microarray* ou que apresentavam CNVs reportados na literatura como polimorfismos.

### 4.2. TERMO DE CONSENTIMENTO

Os responsáveis pelos pacientes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aceitando participar da pesquisa de “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico.” Todos permitiram a coleta do sangue da criança e se preciso dos pais, para a realização da análise de *microarray* e a publicação dos dados e fotos dos pacientes em reuniões e publicações científicas( Anexo I).

Esse trabalho foi aprovado do pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo II).

#### 4.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA.

Os pacientes foram avaliados pela Equipe de Genética Clínica do ambulatório de genética do HUB, sendo realizada anamnese completa, incluindo o heredograma com, no mínimo, três gerações e exame físico detalhado, procurando avaliar o desenvolvimento cognitivo e descrever as características fenotípicas. Foram coletadas amostras de sangue (4mL) dos pacientes, que apresentavam cariótipo normal, em tubo contendo EDTA para a realização da análise por *microarray*. Foi solicitada coleta de sangue em EDTA dos pais, quando a análise por *microarray* apresentou-se alterada.

Os pacientes foram selecionados para o estudo com base na anamnese e exame físico detalhados, sendo priorizados aqueles portadores de deficiência intelectual associada a malformações importantes, como defeito de membros e defeitos cardíacos ou dismorfias faciais, como sugerido por De Vries (2001).

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA foi feita a partir do sangue periférico pelo método Puregene “*Salting out*”. Este método é dividido em etapas, sendo a primeira de lise celular, onde foi utilizado 5mM de cloreto de magnésio, 1mM EDTA pH 8.0 em uma reação; 10mM de tripsina pH 7.5, 1mM EDTA pH8.0 e 1% sódio dodecilsulfato( SDS) em outra. Para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Para a segunda etapa utilizou-se 1 ml da solução de

precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de acetato de amônia. Centrifugou-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formam um *pellet* marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon contendo 3ml de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse um novelo de DNA. A reação foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 3ml de etanol absoluto. A reação foi novamente centrifugada. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescentou-se ao tubo com o DNA, 200-250 µl de tampão tripsina/EDTA 1 vez, que resultou em uma concentração aproximada de 400 ng/µl. O DNA foi armazenado a 2-8°C.

O DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific)

#### 4.5 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY

As amostras foram investigadas quanto à presença de alterações cromossômicas por CMA, utilizando a plataforma CytoScan 750K (Affymetrix). Essa plataforma possui cerca de 750.000 sondas, sendo 200.000 SNPs que permitem uma alta resolução, tanto de variações no número de cópias quanto de perda de heterozigose.

A técnica de CMA permite analisar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de seqüências alvo do genoma. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip (*GeneChip*<sup>®</sup>) de DNA. Essa tecnologia é uma das mais sensíveis na detecção de CNVs, sendo caracterizada por apresentar microarranjos de DNA formados por 550.000 sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, cobrindo uma distância média de 4.1 Kb, e cerca de 200.000 sondas de SNPs. O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em ***GeneChip***<sup>®</sup>,

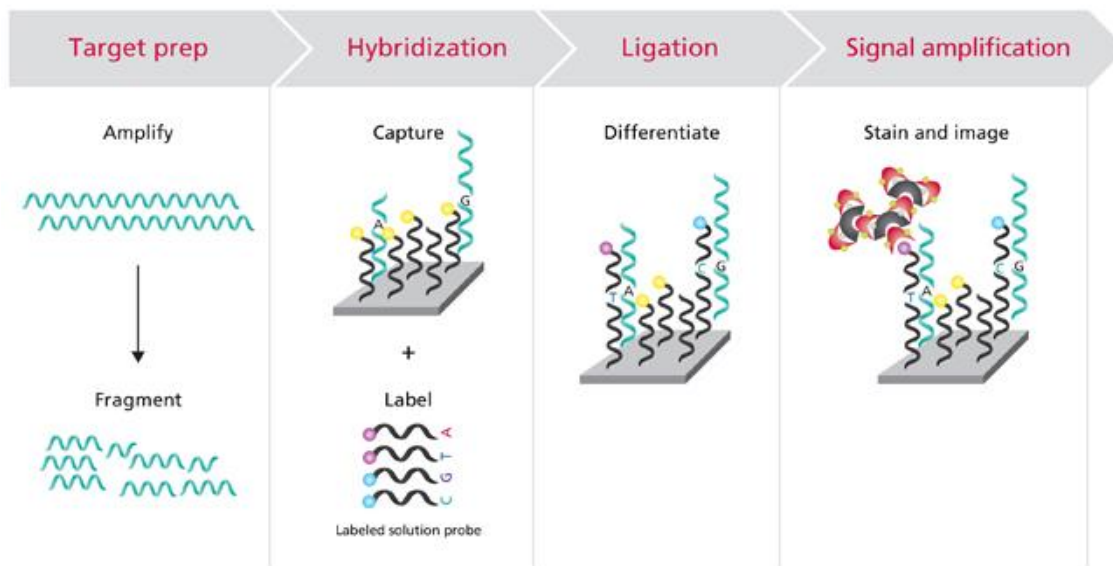
conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos SNPs e das CNVs. Um diferencial desta plataforma, é que é possível analisar, tanto número de cópias alelo-específicas quanto genótipos de SNPs. Além disso, ela confirma independentemente as variações no número de cópias com informações alélicas de SNPs. Tudo isso garante que essa tecnologia de *microarray* tenha uma das mais abrangentes e relevantes coberturas de genes constitucionais em um único *array*. Assim, há uma cobertura de 100% dos genes constitucionais do *The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium* (ISCA) disponível em <https://www.iscaconsortium.org>, cobrindo ainda, cerca de 83% dos genes do OMIM® e mais de 36.000 genes do RefSeq (*NCBI Reference Sequence Database*).

Para a realização deste experimento, o DNA genômico (250 ng) extraído dos pacientes e de seus respectivos pais biológicos mais um controle negativo e um controle positivo (fornecido pela *Affymetrix*, EUA), foi digerido pela enzima de restrição *NspI*, seguindo as recomendações do fabricante (*Affymetrix*, EUA). Depois de digeridas, as amostras foram ligadas a adaptadores. Em seguida, um iniciador universal que reconhece a sequência do adaptador ligado ao DNA genômico foi utilizado para amplificar as sequências obtidas por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

As condições da PCR foram otimizadas para amplificar preferencialmente fragmentos de 150 a 2.000 pb de comprimento, que foram confirmados posteriormente em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, e submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm por 1 hora. Em seguida, estes produtos foram purificados, utilizando-se nanopartículas magnéticas e quantificados no espectrofotômetro *Nanodrop™ 2000c* (*Thermo Scientific*, EUA). O passo seguinte foi a fragmentação das amostras purificadas em 50-200 pb, que em seguida foram confirmados em um gel de agarose a 4% e submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h. Os fragmentos de DNA com 50-200 pb foram revelados pela coloração do gel com solução de brometo de etídeo (5mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando-se o sistema de vídeo-

documentação *ImageMaster®VDS – Video-documentation System (Pharmacia Biotech, EUA)*.

Seguindo o protocolo, os fragmentos de DNA foram marcados por *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* e então aplicados no *Affymetrix GeneChip®* e hibridados por 16-18 horas a 50°C e 60 rpm no *GeneChip® Hybridization Oven 645 (Affymetrix, EUA)*. Os *chips* foram então, lavados e corados na *GeneChip® Fluidic Station 450 (Affymetrix, EUA)*, onde as sondas hibridizadas são ligadas a elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotinilado antiestreptavidina) para a geração da fluorescência, durante a leitura dos **GeneChip® com o laser**. Os chips são então, escaneados no *GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, EUA)*, operados pelo *Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC, Versão 4.1.2)*. A partir daí são gerados arquivos “.CEL”, que são convertidos em arquivos “CYCHP” pelo software de análise *Affymetrix® Chromosome Analysis Suite v2.1 (ChAS)* que combina os dados das fluorescências de cada sonda, representando cada região do genoma humano, com os disponíveis no banco de dados *NetAffx® Genomic Annotation file NA33.1 (Hg19)*. Este sistema de comparação de hibridização contém informações atualizadas dos bancos de dados genômicos *Database of Genomic Variants (DGV)*, *OMIM®* e *RefSeq* e tornam possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigosidade) ao longo do genoma de cada amostra. Todo este procedimento leva de 4 a 5 dias para ser concluído e foram corridas 16 amostras por reação. Uma esquematização das realizações de cada um dos passos descritos está representada na Figura 5.



**Figura 5.** Resumo das etapas da técnica de SNP *array* pela plataforma CytoScan (Affymetrix). A primeira etapa é a amplificação por PCR e purificação do DNA extraído, seguida pela marcação e hibridação, posteriormente ligação ao fluorocromo e por último captura do sinal para a comparação com o banco de dados. Adaptada do site do laboratório Affymetrix.

A análise dos dados gerados pela hibridação do genoma de todos os pacientes e de seus pais biológicos foi realizada com a utilização do *Affymetrix® Chromosome Analysis Suite v 2.1 (ChAS) Software*. Foram fixados como filtros: 30 sondas (aproximadamente 120 Kpb), para detectar duplicações cromossômicas, e 15 sondas (aproximadamente 60 Kpb) para detectar deleções (inclusive em mosaico), seguindo sugestão do fabricante. Os dados genômicos só foram analisados após terem passado pelos controles de qualidade do software. Todas as alterações no número de cópias registradas pela filtragem foram rigorosamente analisadas e os ruídos (alterações encontradas em regiões cobertas por menos de 75% de sondas) foram descartados deste estudo. Além disso, as CNVs encontradas foram comparadas também com banco de dados de indivíduos com síndromes genéticas conhecidas, como *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER)*, disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk/application/>, e com as alterações no genoma de seus pais biológicos. Elas foram classificadas como patogênicas, possivelmente patogênicas, neutras e de significado desconhecido, de acordo

com o proposto por Miller et al. (2010). Foram coletadas Informações como: tipo (deleção ou duplicação), extensão da CNV, número de cópias envolvidas, cromossomo e banda cromossômica, tamanho e número de marcadores e genes envolvidos nas alterações.

A interpretação clínica de um resultado de *CMA* precisa comparar as alterações genômicas encontradas com as variações normais descritas previamente no genoma humano por pesquisadores de todo o mundo e registradas nos bancos de dados genômicos sobre polimorfismos genéticos (<http://www.gdb.org/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) ou com as deleções, duplicações relacionadas a fenótipos específicos como registradas no DECIPHER.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigadas alterações cromossômicas pela análise cromossômica por *microarray* em 50 pacientes com DI/ ADNPM associada a dismorfias ou malformações. Foram identificadas alterações em 18 pacientes como mostra a Tabela 4. Desses pacientes, 9 são do sexo masculino e 9 do sexo feminino.

As alterações foram classificadas considerando-se o tipo de alteração (deleção, duplicação), tamanho, genes contidos, padrão de herança e informação do banco de dados de alterações patogênicas e não patogênicas, conforme recomendações da literatura (Miller, 2010).

Paciente	Sexo	Região alterada	Tamanho	Herança	Classificação	Principais genes envolvidos/ OMIM	Características Clínicas
1	F	del 6p24.3/dup 10p12.21-p13.3	5Mb/21Mb	<i>De novo</i>	Patogênica	<i>FOXC1/ 602482</i>	ADNPM, face triangular, hipoplasia de face média, fontanelas, amplas, aparente hipertelorismo, raiz nasal baixa e ampla, ponte baixa, narinas antevertidas, língua protusa, palato alto e estreito, pectus excavatum, "pads" em quirodáctilos, primeiros quirodáctilos alargados e de implantação proximal, unhas hipoplásicas, clinodactilia de quintos quirodáctilos, ânus anteriorizado. Alterações oftalmológicas: pupilas distópicas e deformadas de forma oblíqua, acentuada hipoplasia do epitélio pigmentar retiniano. Malformação de Dandy-Walker. <b>HD: Síndrome de Axenfeld Rieger.</b>
2	F	trip Xp11.22	63Kb	Paterna	<i>VOUS</i>	<i>HUWE1</i>	DI, testa abaulada, sobrancelhas grossas e arqueadas, estrabismo divergente, boca reta, filtro médio, palato alto, aparente fusão entre incisivo e canino inferior direito. Mamilos extranumerários bilateralmente na linha mamária, prega única em mão direita, dedos afilados, membros proporcionados, presença de mancha acastanhada no membro inferior direito e dimple sacral

3	M	del 7q31.1	1,18 Mb	<i>De novo</i>	Patogênica	<i>IMMP2L</i>	DI, tendência à obesidade, nariz curto e antevertido, raiz nasal muito baixa, epicanto bilateral, filtro curto, marcado. Lábio superior em tenda, tendência a ficar de boca entreaberta, deixando antever os incisivos centrais, palato alto, retrognatia, orelhas com hélices pouco dobradas, pequenas e rodadas para trás.
4	F	del 7q11.23	1.4 Mb	<i>De novo</i>	Patogênica	194050	DI, microcefalia, microrretrognatia, palato alto e estreito, sobrancelhas arqueadas e grossas, nariz pequeno, filtro longo, orelhas arredondadas, membros proporcionados, cúbito valgo, prega transversal em mão direita, quinto dedo curto com uma única prega de flexão, mão esquerda com pregas normais, quinto dedo curto e com pregas de flexão, pés com cavalgamento do quinto pododáctilo sobre o quarto e baixa estatura. <b>HD: Síndrome de Williams</b>
5	F	dup X p11.23	6.6 Mb	-	<i>VOUS</i>	<i>SHOX</i>	DI, microcefalia, fendas palpebrais discretamente oblíquas ascendentes, lábios grossos, dentes desalinhados, palato fundo, mãos e dedos longos, pectus ligeiramente escavatum, habitus longilíneo

6	M	dup 11p15	2.0 Mb	<i>De novo</i>	<i>VOUS</i>	<i>IGF-2</i>	ADNPM, epicanto bilateral, fendas palpebrais discretamente oblíquas ascendentes, dermóide pré-auricular à direita, dermóide bulbar lateral em olho E, hérnia umbilical.
7	M	dup 7p22.3-22.1	6,7 Mb	<i>De novo</i>	<i>Patogênica</i>	<i>TWIST/ACTB, RNF216L, FSCN1</i>	DI, macrocrania, achatamento ântero-posterior, fronte olímpica, hipertelorismo, fontanela anterior aberta, assimetria facial, paralisia facial direita, língua protusa, nariz largo, orelhas com implantação baixa, pequenas e rodadas para trás, escoliose lombar e abaulamento de flanco direito, testículos retráteis.
8	M	del 17q11.2	900 Kb	De novo	<i>VOUS</i>	<i>FOXN1</i>	ADNPM, protusão occipital, retrognatia, fenda palatina, raiz nasal baixa, nariz curto e pequeno
9	F	del 10q22-23	7,7Mb	-	<i>Patogênica</i>	<i>PTEN/BMPR1A</i>	DI, fendas palpebrais pequenas, oblíquas ascendentes, nariz bulboso, protusão de arcada dentária superior, habitus longilíneo
10	F	del 12p13 (mosaico)	2.9 Mb	De novo	<i>Patogênica</i>	<i>ELKS/ERC1</i>	DI, orelhas em abano, hélices sobredobradas, face pequena, fendas palpebrais pequenas e voltadas para baixo, raiz nasal alta, palato alto e estreito, retrognatia, dentes com implantação irregular, membros proporcionados, não tem desenvolvimento mamário, quinto dedo curto e curvo (clinodactilia) com 1 prega de flexão única em quinto dedo E.
11	M	del Xp11.3	200 Kb	De novo	<i>Patogênica</i>	<i>NDP/310600</i>	ADNPM, hipotelorismo ocular, microftalmia, ausência de reflexo fotomotor direto e consensual. <b>HD: Síndrome de Norrie.</b>

12	M	dup 1p31.3/ del 4q35.2	100Kb/377Kb	Materna e paterna	Possivelmente benigna		ADNPM, nariz com raiz e ponte altas, retrognatia, implantação baixa de orelha esquerda, orelhas rodadas para trás, prega transversal em mão direita, hipertrofia de glândulas mamárias.
	F	Del Xp 22.33	9.4MB		<i>Patogênica</i>	<i>SHOX</i>	DI, baixa estatura, face arredonada, mesomelia, deformidade de Madelung
14	M	dup 2p16.2/ del 4q22.3	500Kb/200Kb	-	VOUS	SMEK2/ EFI4E	ADNPM, edema periorbital bilateral, narinas amplas, palato ogival, hipoplasia de face média, pele marmorata, prega palmar transversal em mão esquerda e de transição em mão direita, bolsas testiculares hipoplásicas
15	F	del 1q31.2	1.2 Mb	<i>De novo</i>	Possivelmente patogênica	<i>PTPRC</i>	DI, estrabismo convergente, orelhas em abano, clinodactilia dos quintos quirodáctilos
16	M	del 22q11.21	3.1 Mb	<i>De novo</i>	<i>Patogênica</i>	192430/188400	DI, nariz adunco, sem hipoplasia de asas nasais, palato alto, micrognatia, sobredobramento de hélices, orelhas pequenas, dedos longos, clinodactilia de quintos pododáctilos. <b>H.D:Síndrome Velocardiofacial/ Di George..</b>
17	F	del 11p13.12	5 Mb	<i>De novo</i>	<i>Patogênica</i>	<i>PAX6/WT1</i>	ADNPM, microbraquicefalia, orelhas com baixa implantação, aparente hipertelorismo, raiz nasal baixa, narinas antevertidas. Dentes pequenos, com quedas em face oclusal. Fenda palatina pós-forame incisivo, com úvula bífida. Pescoço algo encurtado. Tórax simétrico. Hiperconvexidade de unhas de mãos e pés.
18	M	del 8q21.3- 22.1	9,3 Mb	<i>De novo</i>	<i>Patogênica</i>	608156	DI, fronte em quilha, face arredondada, olhos grandes, sobrancelhas lateralizadas, ptose palpebral bilateral, aparente hipertelorismo, raiz nasal baixa, ponta do nariz com sulco mediano, filtro longo com sulco pouco visível, boca pequena com mucosas finas, queixo pequeno, pé torto redutível, hérnia umbilical, <i>dimple</i> sacral. <b>H.D:Síndrome de Nablus.</b>

## Paciente 1

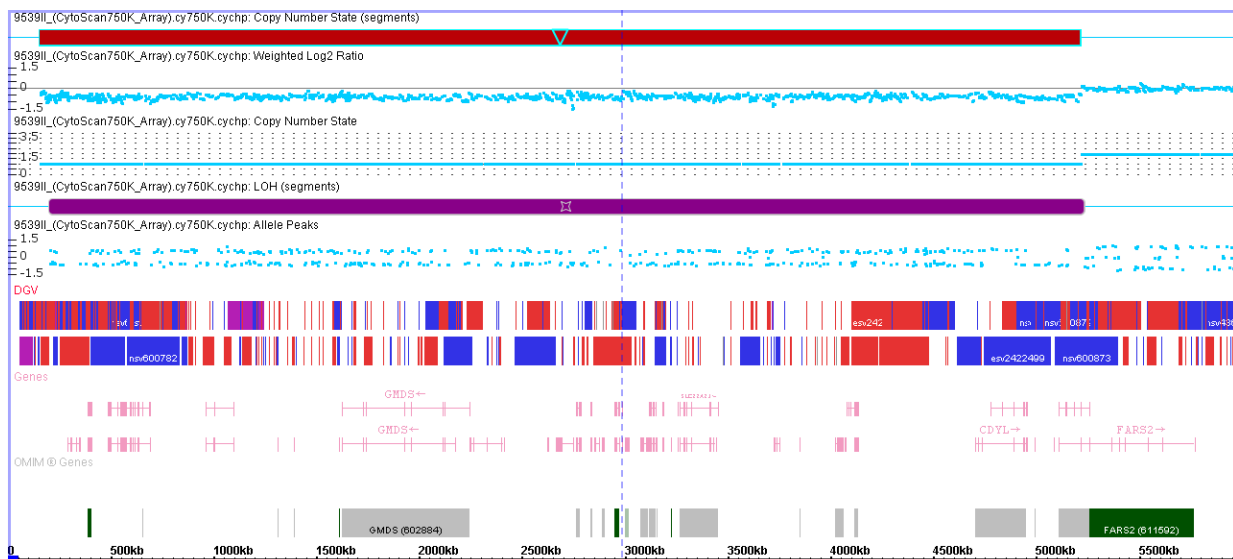
A paciente 1 (Figura 6), avaliada com 1 mês de vida, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor importante, face triangular, hipoplasia de face média, fontanelas amplas, hipertelorismo ocular, fendas horizontais, raiz nasal baixa e ampla, ponte baixa, narinas antevertidas, língua protusa, palato alto e estreito, pectus excavatum, primeiros quirodáctilos alargados e de implantação proximal, unhas hipoplásicas, clinodactilia de quintos quirodáctilos, ânus anteriorizado. A ressonância magnética de crânio evidenciava hidrocefalia, malformação de Dandy-Walker. A avaliação oftalmológica mostrava pupilas distópicas e deformadas de forma oblíqua, acentuada hipoplasia do eptélio pigmentar retiniano. A ecografia de abdome revelava ectasia da pelve renal à esquerda .



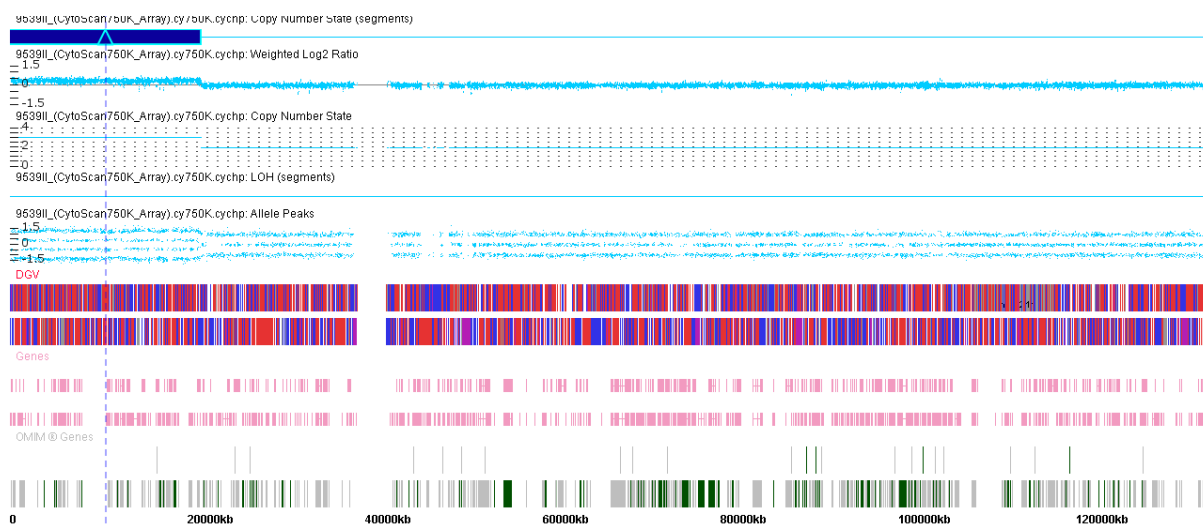
Figura 6. Paciente 1. Paciente com hipertelorismo ocular, raiz nasal baixa, narina antevertida e protusão lingual.

A análise por *microarray* dessa paciente mostrou del 6p, arr(hg19)6p24.3(158,074-5,218,458)x1 (Figura 7) e dup10p, arr(hg19)10p12.21-p13.3 (100,047-21,480,387)x3 (Figura 8). A deleção 6 p é de cerca de 5Mb e engloba o gene *FOXC1* (Forkhead Box C1) que está relacionado à síndrome de Axenfeld-Rieger tipo 3 (OMIM #602482) que é um desordem autossômica dominante caracterizada por anormalidades das estruturas do segmento anterior do olho, como anomalia de Peters, hipoplasia de íris, policoria, embriotoxo posterior ou aniridia. Algumas anomalias sistêmicas também podem estar associadas, como dismorfias faciais, anormalidades dentárias, pele periumbilical redundante. Pacientes com essa síndrome também têm um risco aumentado de desenvolver glaucoma e cegueira progressiva pela morte das células ganglionares da retina (Rudnicka, 2006; Leske, 2007). O gene *FOXC1* pertence à família de fatores de

transcrição FOX que compartilha um domínio de ligação do DNA conhecido como Forkhead, domínio que é importante para o desenvolvimento ocular (Tumer, 2009). Os outros genes envolvidos nesse segmento acarretam alterações crânio-faciais, esqueléticas, cardíacas, surdez e hidrocefalia. A paciente apresentava também uma duplicação 10p de 21Mb, que abrange muitos genes e provavelmente contribui para o fenótipo. No entanto nenhum dos genes mapeados nesse segmento se destaca como tendo um papel principal no quadro clínico da paciente. Em revisão do cariótipo foi observado tratar-se de translocação entre os cromossomos 6 e 10. Os pais da paciente tinham cariótipo e CMA normais.



**Figura 7.**Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19) 6p24(158,074-5,218,458)x1.



**Figura 8.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19)10p12.21-p13.3 (100,047-21,480,387)x3.

## Paciente 2

A paciente 2 (Figura 9), com 6 anos, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado. Tinha as seguintes características fenotípicas: testa abaulada, sobrancelhas grossas e arqueadas, estrabismo divergente, columela curta, boca reta, lábios finos, filtro médio, palato alto, aparente fusão entre incisivo e canino inferior direito, mamilos extranumerários bilateralmente na linha mamária, prega única em mão direita, dedos afilados, presença de mancha acastanhada no membro inferior direito, face medial, *dimple* sacral.



**Figura 9.** Paciente 2. Paciente com testa abaulada, sobrancelhas grossas e arqueadas, estrabismo convergente, lábios finos.



A análise por *microarray* evidenciou que a paciente tem uma triplicação de 60kb no braço curto do cromossomo X, arr(hg19) Xp11.22 (53,556,870-53,620,176)x4 (Figura 10), que contém o gene *HUWE1*. Os pais da criança são consanguíneos e foram testados, sendo identificada duplicação dessa região no pai que é fenotipicamente normal. A mãe não apresentou alteração na análise por *microarray*.



**Figura 10. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19)Xp11.22(53,556,870-53,620,176)x4. Essa região abrange parte do gene *HUWE1*.**

O gene *HUWE1* (HCECT, UBA e WWE) domínio proteína I codifica uma proteína ligase envolvida na oncogênese. A superexpressão desse gene aumenta o supressor tumoral TP53 com sua subsequente degradação (Yoon , 2005). O TP53 é implicado na manutenção do balanço entre a geração contínua de neuroblastose e sua eliminação pela apoptose (Medrano, 2005). Níveis reduzidos de TP53 acarretam anormalidades de desenvolvimento do sistema nervoso central. Esse processo ocorre em parte pela superprodução de neurotransmissores (Yi, 2007). Além disso, a ubiquitinação e degradação proteica são implicadas na função neuronal e mutação em várias proteínas envolvidas com a ubiquitinação tem sido relatadas na deficiência intelectual.

Disfunção do metabolismo da ubiquinase é uma marca em várias

doenças neurológicas como Parkinson e Huntington (Ross,2004; Bennett,2007).O *HUWE1* é um gene dose-sensível cuja superexpressão resulta em déficit cognitivo em meninos. Mulheres portadoras da duplicação desse gene são normalmente portadoras saudáveis (Froyen, 2012).

Na literatura há relatos de meninos com duplicação do gene *HUWE1* que apresentam deficiência intelectual, alteração na linguagem, distúrbio de comportamento que pode variar de hiperatividade ao transtorno do espectro autista e algumas dismorfias faciais leves.

Santos-Rebouças, em 2015, descreveu uma menina com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual leve e algumas dismorfias faciais: face triangular e achatada, prognatismo, raiz nasal alta, filtro curto, palato estreito, dentes pequenos e quadrados, incisivos superiores separados e pés cavos. A mãe dessa paciente era fenotipicamente normal, mas a análise por *microarray* evidenciou que a mãe era portadora da duplicação. Nessa paciente afetada foi observado um desvio de inativação do cromossomo X.

Nesse mesmo estudo foi relatado um menino afetado que apresentava a duplicação *HUWE1* cuja mãe era portadora dessa duplicação e apresentava deficiência intelectual leve. Nessa mãe também foi comprovado o desvio de inativação do X.

Froyen em 2012 analisou uma família com quatro cópias de parte do gene *HUWE1*, porém, a região detectada não foi correlacionada à deficiência intelectual por haver homens portadores dessa alteração que eram saudáveis. Foi então caracterizada uma variação polimórfica que é caracterizada por um ganho parcial do gene *HUWE1* que deve ser distinguida da região Xp11.22 incluindo o *HUWE1* que causa deficiência intelectual (Figura 11).

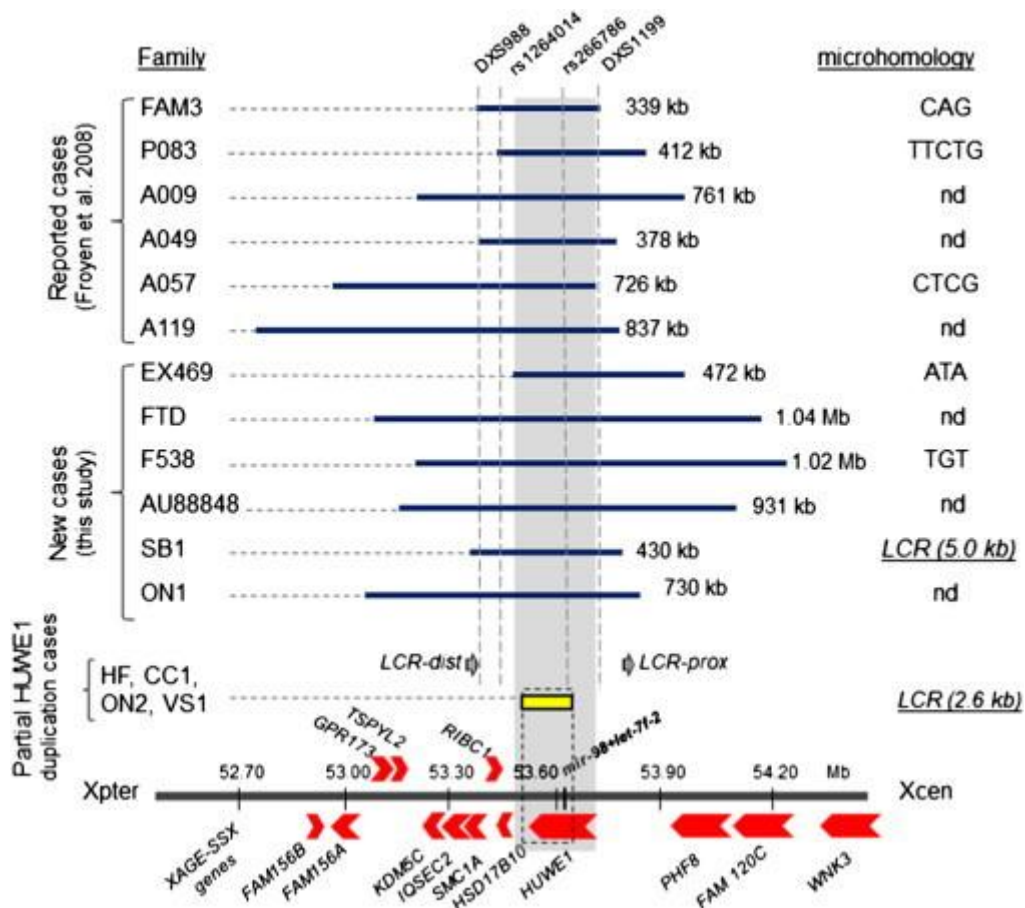


Figura 11. Visão geral das 12 microduplicações não-recorrentes e 4 microduplicações recorrentes do Xp11.22. A região em amarelo corresponde ao polimorfismo não patogênico (adaptada do *American Journal of Human Genetics*, 2012).

Nesse mesmo estudo foi identificada uma região mínima comum de 228 Kb que começa em 53,501,669 e termina em 53,729,682 e inclui o gene HUWE1, cuja superexpressão sugere fortemente estar relacionada com a deficiência intelectual dos pacientes analisados (Figura 12).

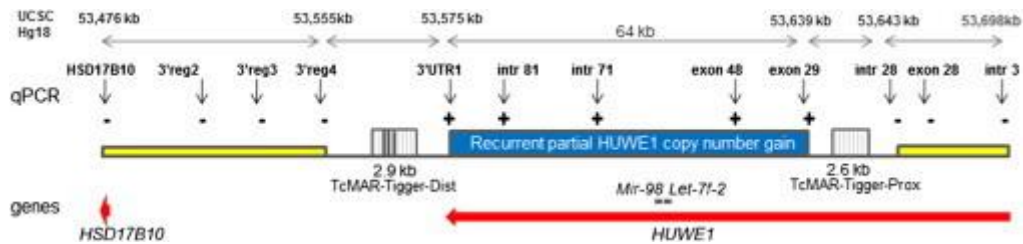


Figura 12. Em azul está representada a região comum do HWE1, que inclui o intron 28 desse gene e é fortemente sugerida como causa de deficiência intelectual quando há aumento do número de cópias ( adaptada do *American Journal of Human Genetics*, 2012).

### Paciente 3

O paciente 3 (Figura 13), aos 9 anos, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, especialmente na fala, dificuldade escolar, distúrbio de comportamento (agressividade, pouca interação social), tendência à obesidade, sinofre, nariz curto e antevetido, raiz nasal muito baixa, epicanto bilateral, filtro curto bem marcado, boca em tenda, tendência a ficar de boca entreaberta deixando os incisivos centrais aparentes, palato alto, retrognatia, orelhas com hélices pouco dobradas, pequenas, rodadas para trás.



Figura 13. Paciente 3. O paciente apresenta sinofre, narinas antevetidas e, boca em tenda.

A análise por *microarray* do paciente 3 evidenciou deleção 7q de 1Mb, arr(hg19)7q31.1(109,427,542-110,607,579)x1(Figura 14), que contém o gene *IMMP2L* (*IMP2 inner mitochondrial membrane protease-like*) que codifica a unidade 2 de uma peptidase de membrana interna mitocondrial que é requerida para processar o citocromo c1 e estabilizar a expressão do IMP1

que é a protease requerida para processar o pré-COXII (citocromo oxidase C, subunidade II) e i-citocromo b2. Essas proteínas mitocondriais têm sido relacionadas com desordens neurodegenerativas (Nunnari, 1993). Conseqüentemente um defeito do *IMMP2L* pode induzir a apoptose por uma hiperatividade mitocondrial (Bertelsen, 2014) ou pode afetar a mielinização (Barateiro, 2012). As disfunções mitocondriais são associadas a várias desordens humanas, incluindo alterações neuropsiquiátricas (Fonbonne, 2005).

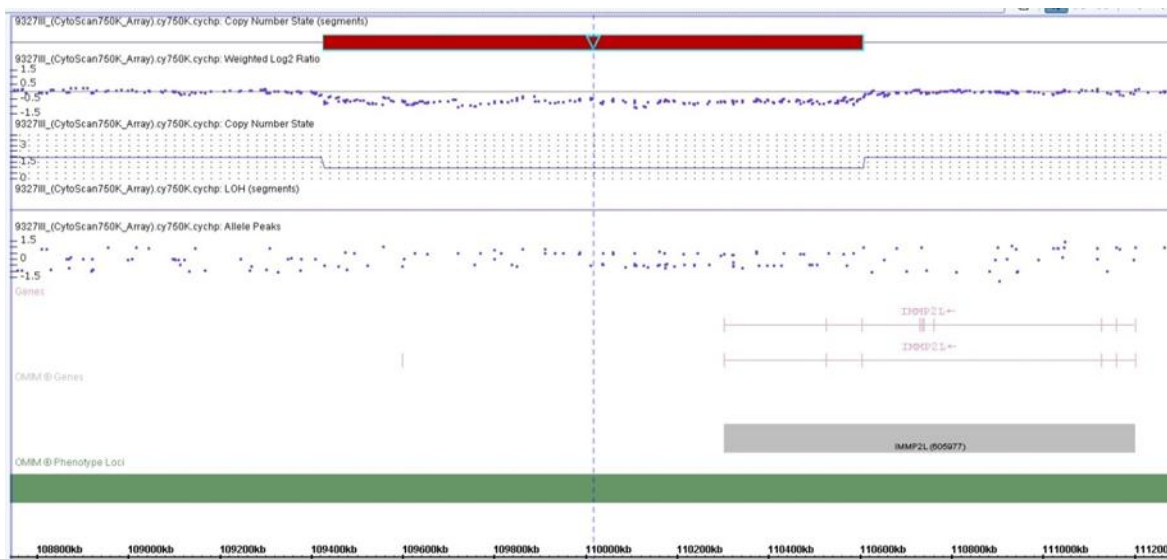


Figura 14. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado. Arr(hg19)7q31.1(109,427,542-110,607,579)x1, que abrange o gene *IMMP2L*, responsável pela síndrome de Tourette.

Recentemente estudos de ligação mostraram que deleção envolvendo o gene *IMMP2L* no gene 7q31.1 está associada com desordens do espectro autista, déficit de atenção e hiperatividade, além da síndrome de Tourette (Gimeli, 2012). Os pacientes com essa alteração apresentam distúrbios, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e de linguagem, epilepsia e microcefalia. Em resumo, a deleção parcial do *IMMP2L* pode agir como um fator de risco para doenças neurológicas. É possível que a penetrância dessa deleção seja incompleta porque podem ser herdadas de pais não afetados. A análise por *microarray* dos pais desse paciente foi normal.

#### Paciente 4

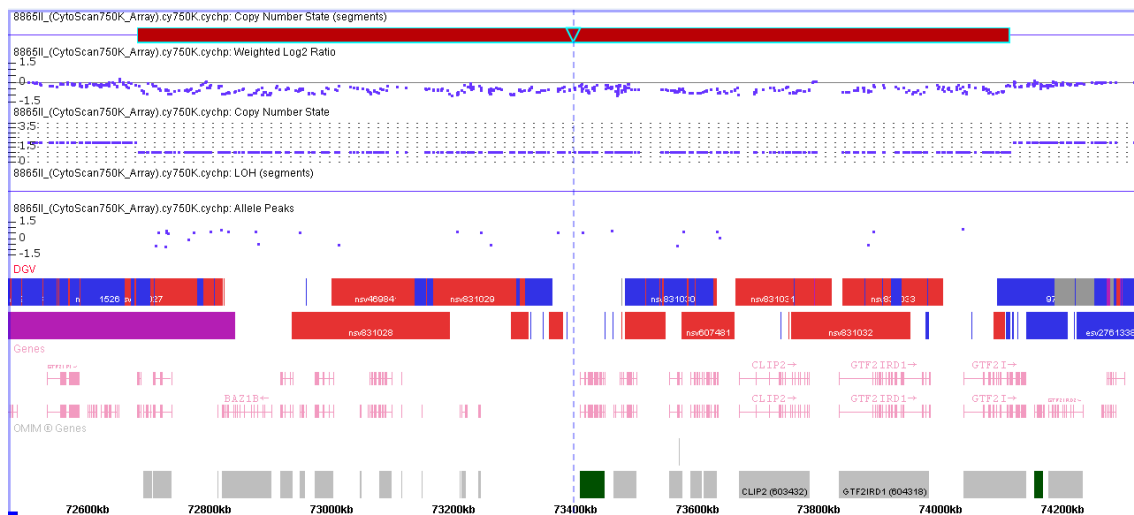
A paciente 4 (Figura 15), primeiramente avaliada aos 7 anos, tinha atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia, microretrognatia, palato alto e estreito, sobrancelhas arqueadas e grossas, nariz pequeno, filtro longo, orelhas arredondadas, membros proporcionados, cúbito valgo, prega transversal em mão direita, quinto dedo curto com uma única prega de flexão, mão esquerda com pregas normais, quinto dedo curto e com pregas de flexão, pés com cavalgamento do quinto pododáctilo sobre o quarto e baixa estatura. Ecografia renal evidenciava agenesia renal esquerda.



**Figura 15. Paciente 4. Paciente com síndrome de Williams. A) Paciente aos 7 anos de idade sem as características típicas da síndrome de Williams. B) Paciente aos 13 anos, já apresentando características fenotípicas da síndrome de Williams: arcada supraciliar proeminente, ponte nasal achatada, hipoplasia malar, bochechas cheias, macrostomia.**

A análise por *microarray* dessa paciente mostrou uma deleção 7q, arr(hg19)7q11.23(72,718,123-74,146,927)x1(Figura 16) com cerca de 1.4 Mb,

que corresponde à região da síndrome de Williams-Beuren (OMIM#194050) que é caracterizada por deficiência intelectual, baixa estatura, estenose supraaórtica e dismorfias faciais típicas: fronte ampla, sobrancelhas alargadas, arcadas supraciliares proeminentes, estrabismo, íris estrelada, ponte nasal achatada, hipoplasia malar com bochechas cheias, lábios espessos, filtro longo, queixo pontudo e boca alargada.



**Figura 16.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, *arr(hg19)7q11.23(72,718,123-74,146,927)*, que corresponde à síndrome de William-Beuren.

Essa paciente teve hipotireoidismo congênito, diagnosticado tardiamente e pode ter contribuído para atenuar as características típicas da síndrome de Williams quando paciente era mais jovem (Figura 15A). Antes da realização do *array* não houve essa suspeita diagnóstica. Os pais não tiveram alteração pela análise de *microarray*.

### Paciente 5

A paciente 5 (Figura 17), com 9 anos, apresentava deficiência intelectual, orelhas em abano, hélices sobredobradas, face pequena, fendas palpebrais pequenas e voltadas para baixo, raiz e dorso nasal altos, palato alto e estreito, retrognatia, dentes irregulares, clinodactilia de quinto quirodáctilo bilateralmente, hemangioma em couro cabeludo em região occipito-parietal, heterocromia em membros inferiores. Ecocardiograma: pequena dilatação de artéria pulmonar.



Figura 17. Paciente 6. Apresenta fendas palpebrais voltadas para baixo, raiz e dorso nasal elevados, dentes desalinhados e heterocromia em membros inferiores.

Essa paciente tem uma deleção 12p com cerca de 3MB, arr(hg19) 12p13(1-3,959,963)x1 (Figura 18) em mosaico. A deleção 12p13 é uma



alteração rara e tem sido descrita em alguns pacientes com deficiência intelectual, distúrbio de comportamento e apraxia da fala (Thevenon, 2013). Algumas dismorfias podem ser encontradas em pacientes com essa deleção como microcefalia, epicanto, hipotelorismo, implantação baixa de orelhas com lobos grossos e antevertidos, narinas alargadas, filtro naso-labial marcado, dentes irregulares e má-oclusão dentária, face miopática, hipotonia, frouxidão ligamentar e hérnia umbilical.

Thevenon et al em 2013 apontou uma região de cerca de 260 kb contida na região 12p13 e que abrange o gene ELKS/ERC1 como sendo a causa das alterações neurológicas em pacientes com essa deleção (Figura 18).



Figura 18. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19) 12p13(1-3,959,963)x1, que contém o gene ELKS/ERC1.

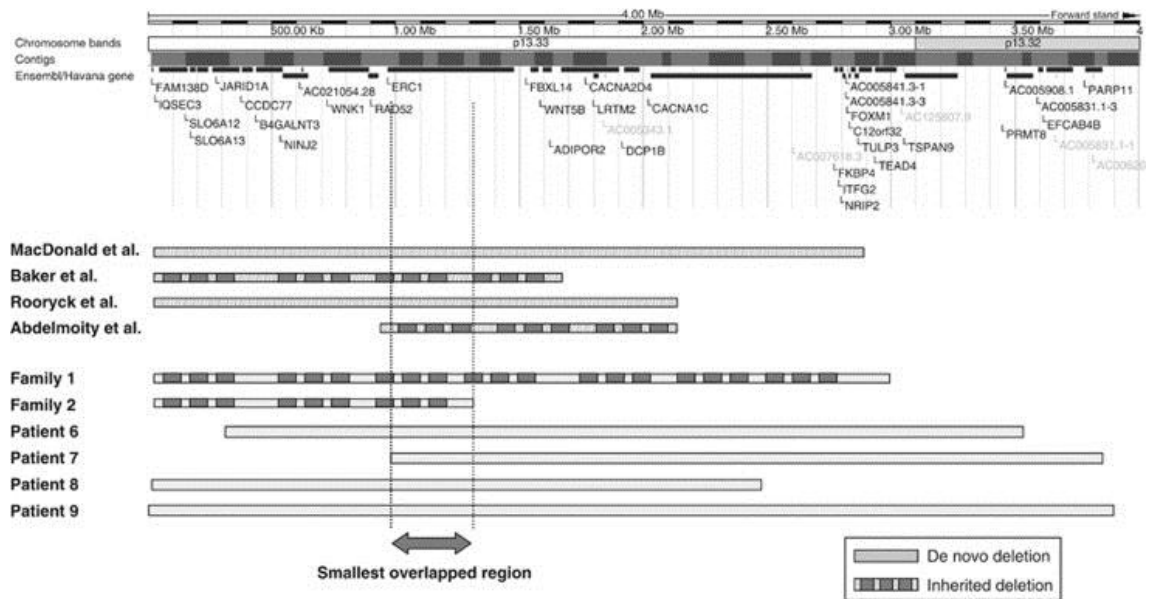


Figura 19. Representação da região correspondente ao gene ELKS/ERC na região 12p13. (Thevenon, 2013)

É interessante notar que a paciente apresenta um padrão de heterocromia em membros inferiores, comumente encontrado em pacientes com mosaïcismo somático.

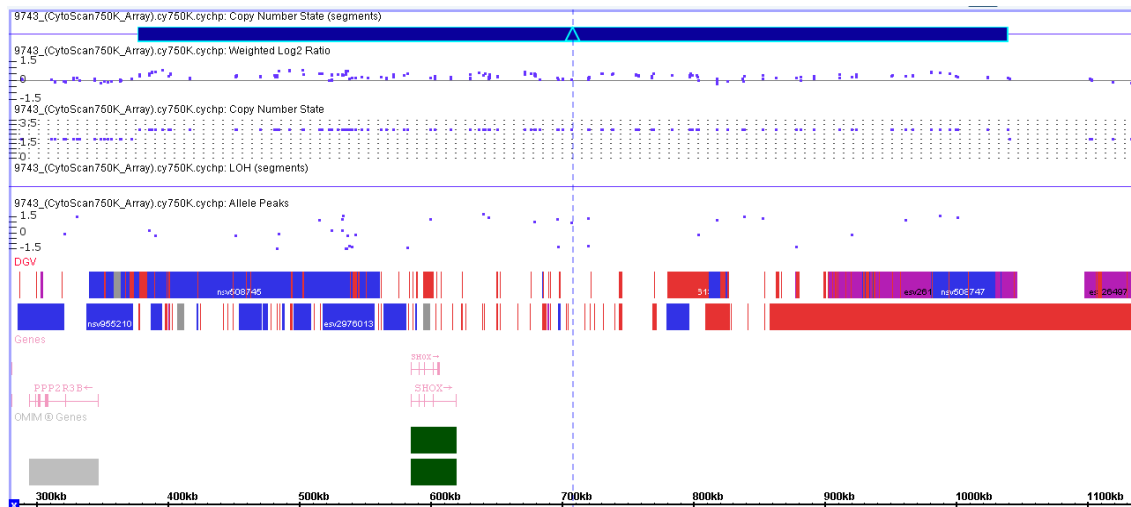
### **Paciente 6**

A paciente 6 (Figura 20), com 12 anos, apresentava dificuldade de aprendizado, microcefalia, fendas palpebrais discretamente oblíquas ascendentes, lábios grossos, dentes desalinhados, palato fundo, mãos e dedos longos, *pectus* ligeiramente *escavatum* e *habitus* longilíneo. Tomografia computadorizada de crânio, ecocardiograma e ecografia de abdome normais.



**Figura 20. Paciente 6. Paciente apresenta microcefalia, fendas palpebrais oblíquas ascendentes, *habitus* longilíneo**

Essa paciente apresenta uma duplicação de cerca de 650 kb no gene *SHOX*:arr (hg19) Xp11.23(377,906-1,039,207)x3 (Figura 21).



**Figura 21.** Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19) Xp11.23(377,906-1,039,207)x3, que abarca o gene *SHOX*.

Duplicações do gene *SHOX* estão relacionadas com a síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausler que é caracterizada pela aplasia dos ductos mulerianos em pacientes do sexo feminino com cariótipo normal e genitália externa feminina. A maioria dos casos é de ocorrência esporádica. Essa alteração, em geral, não está relacionada a deficiência mental. Os pais dessa paciente não foram testados.

### Paciente 7

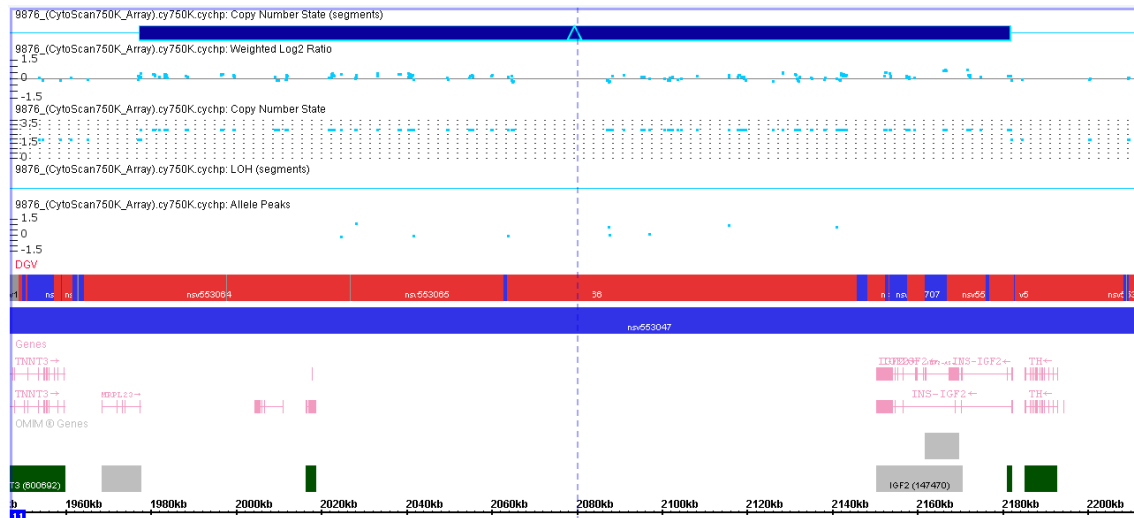
O paciente 7 (Figura 22), com 2 meses de idade, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, epicanto bilateral, fendas palpebrais discretamente oblíquas ascendentes, dermóide bulbar lateral em olho esquerdo, dermóide pré-auricular à direita, boca em tenda, hérnia umbilical. Avaliação oftalmológica: aniridia em olho direito, aniridia em olho esquerdo, catarata polar anterior, dermóide bulbar temporal, hipoplasia de nervo óptico à esquerda. Ecocardiograma: forâmen oval patente e discreta estenose supra-valvar pulmonar e de ramos pulmonares. Ecografia de abdome normal.



Figura 22. Paciente 7. Paciente apresenta dermóide epibulbar lateral de olho esquerdo, dermóide pré-auricular à direita.

A análise por *microarray* desse paciente detectou duplicação 11p, de cerca de 200kb, arr(hg19)11p15(1,977,518-2,181,840)x3 (Figura 23) que corresponde parcialmente à região causadora da síndrome de Beckwith-Wiedemann. O paciente não possui macrossomia, macroglossia e assimetria corpórea que são descritas nessa síndrome. Portanto, a duplicação desse segmento não deve ser suficiente para causar o quadro de síndrome de Beckwith-Wiedemann e não temos como afirmar se a alteração é ou não patogênica. Curiosamente o paciente apresenta aniridia que, em geral, está relacionada ao gene PAX6 que se localiza na região 11p13 (31,806,339-

31,839,508), que apesar de próxima, não está dentro da região deletada identificada pela análise de *microarray*.



**Figura 23.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix®). O retângulo azul representa o segmento duplicado Arr(hg19) 11p15(1,977,518-2,181,840)x3

Os pais desse paciente tiveram análises por *microarray* normais.

### **Paciente 8**

O paciente 8 (Figura 24), com 7 anos, apresentava ADNPM/DI macrocrania, achatamento ântero-posterior do crânio, fronte olímpica, hipertelorismo ocular, columela curta, assimetria facial, orelhas de implantação baixa e escoliose. Tomografia computadorizada do crânio normal.



**Figura 24. Paciente 8. Paciente apresenta macrocrania, achatamento ântero-posterior do crânio, fronte olímpica, hipertelorismo ocular, columela curta, assimetria facial, orelhas de implantação baixa, escoliose.**

A análise por *microarray* do paciente revelou duplicação 7p grande de cerca de 6.7 Mb, arr(hg19) 7p22.3-22.1(43,376-6,784,014)x3 (Figura 25). Essa região contém o gene *TWIST*, que codifica o fator de transcrição da proteína da família *helix-loop-helix*, que desempenha um papel importante na determinação das células mesodérmicas). O gene *TWIST*, em particular, está envolvido na ossificação que ocorre durante a formação frontal, parietal e malar (Chen, 1995; Borgeois, 1998). Haploinsuficiência do *TWIST* tem sido associada com a síndrome de Saethre-Chotzen que é caracterizada por craniossinostose, face achatada, nariz longo e pontudo, órbitas rasas, plagiocefalia, orelhas pequenas e rodadas posteriormente, com crus longa e proeminente, fenda palatina, e anormalidades das mãos incluindo sindactilia do segundo e terceiro quírodáctilos, falanges distais bífidas, defeitos cardíacos congênitos e

contratura dos ombros e joelhos. Na duplicação 7p ocorre o atraso de fechamento de fontanela que é o oposto da craniossinostose que é encontrada na deleção 7p (el Ghouzzi, 1997).

Outros genes presentes nessa região são o *ACTB*, *RNF216L* e o *FSCN1*. O gene *ACTB* codifica uma b-actina que é um componente essencial do citoesqueleto celular e é um forte candidato às dismorfias crânio-faciais associadas ao segmento 7p22.1. O gene *RNF216L* codifica uma proteína ligase da ubiquitina E3 expressa no tecido cerebral durante o desenvolvimento e está associada a regulação de fatores de transcrição como o p53. Os complexos ubiquitina-ligases estão relacionadas com doenças neuropsiquiátricas como transtorno bipolar, esquizofrenia, autismo, deficiência intelectual, Parkinson e síndrome de Angelman. O gene *FSCN1* codifica a fascina, uma proteína envolvida no crescimento e desenvolvimento neural. Ela é expressa em células dendríticas, células epiteliais, células gliais e neurônios e desempenha um papel crítico no funcionamento das células dendríticas e no estabelecimento dos circuitos neuronais (Goitia,2015).

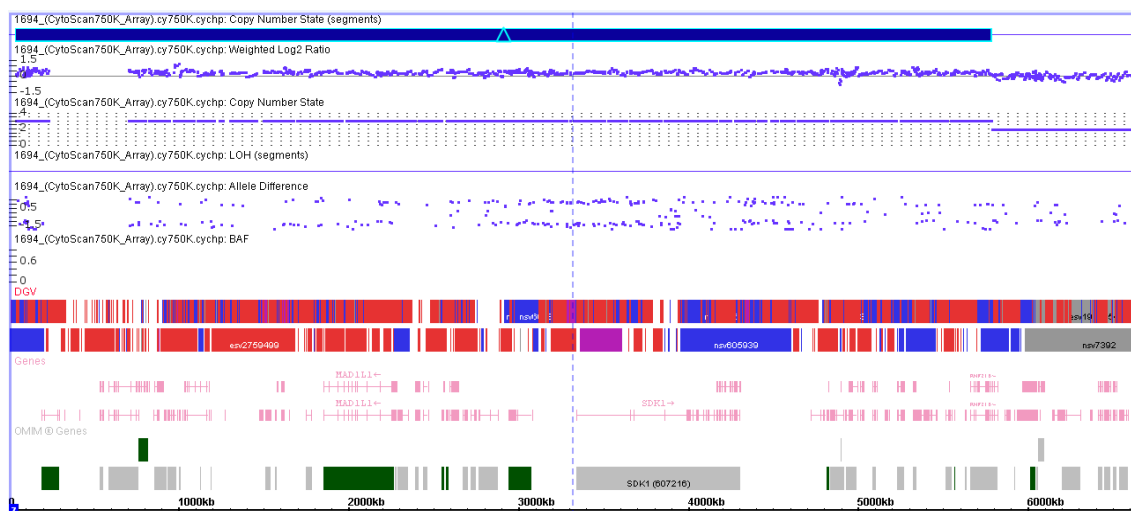


Figura 25. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19) 7p22.3-3p22.1(43,376-5,784,014)x3.

Pacientes com a duplicação 7p apresentam um espectro fenotípico que inclui: dismorfias crânio-faciais, braquicefalia, atraso de fechamento das fontanelas, hipertelorismo ocular, orelhas largas e protusas, depressão da



ponte nasal, boca pequena com comissuras labiais voltadas para baixo, palato alto e arqueado, micrognatia, baixo peso ao nascimento, criptorquidia, defeito cardíaco, luxação de quadril, hipotonia, deficiência intelectual e autismo. (Mégarbané, 2001).

### **Paciente 9**

A paciente 9 (Figura 26), com 13 anos, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldade de aprendizado, microcefalia, fendas palpebrais oblíquas ascendentes, hipertelorismo ocular, nariz bulboso, protusão da arcada dentária superior, orelhas de implantação baixa, mãos e pés grandes, *habitus* longilíneo.



**Figura 26. Paciente 9. Apresenta microcefalia, hipertelorismo ocular, nariz bulboso, *habitus* longilíneo.**

A análise por *microarray* dessa paciente mostrou uma deleção no braço longo do cromossomo 10 de 7,7 Mb, arr(hg19)10q22.3(81,439,533-89,142,185)x1 (Figura 27). região envolve o gene *PTEN* responsável pela síndrome de Cowden e Bannayan-Riley-Ruvalcaba e o gene *BMPR1A* que causa a síndrome da polipose juvenil. Essa paciente não possui características

clínicas da síndrome de Cowden que inclui macrocrania e triquelomas cutâneos e nem de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, como manchas hiperocrômicas.

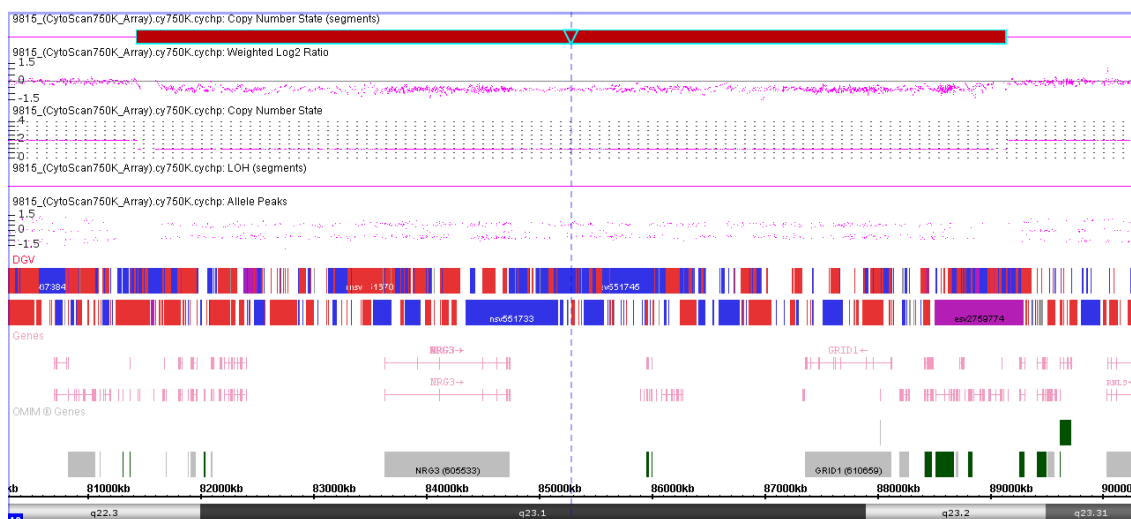


Figura 27. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19)10q22.3(81,439,533-89,142,185)x1 que abrange o gene da polipose juvenil *BMRP1A*.

A Polipose Juvenil é uma desordem autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos pólipos hamartomatosos no trato gastrointestinal. (Chow, 2005; Haidle, 2011). Portadores de mutações no gene da Polipose Juvenil têm risco aumentado de neoplasia maligna gastrointestinal. O gene responsável é o *BMPR1A* (*Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A*) que codifica um receptor envolvido na via de sinalização BMP.

Balciuniene, em 2007, reportou o caso de 2 pacientes com deleção do gene *BMPR1A*, sem deleção do PTEN e que apresentavam atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, macrocrania e não tinham evidência de pólipos.

Outras características clínicas que podem estar presentes nos pacientes com a deleção 10q22.3-23.3 são baixa estatura, mãos e pés pequenos, ponta nasal alargada, filtro longo, telecanto, orelhas hipoplásicas, cabeça pequena e pele redundante no pescoço, hérnia umbilical pequena, hipoplasia de músculos oblíquos, vascularização evidente em tórax e abdome, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e de linguagem. Não foi realizada análise

por *microarray* dos pais porque paciente foi abandonada pelos pais e é cuidada pela tia materna. No entanto, pelo tamanho e localização da deleção, podemos afirmar que trata-se de alteração patogênica.

### **Paciente 10**

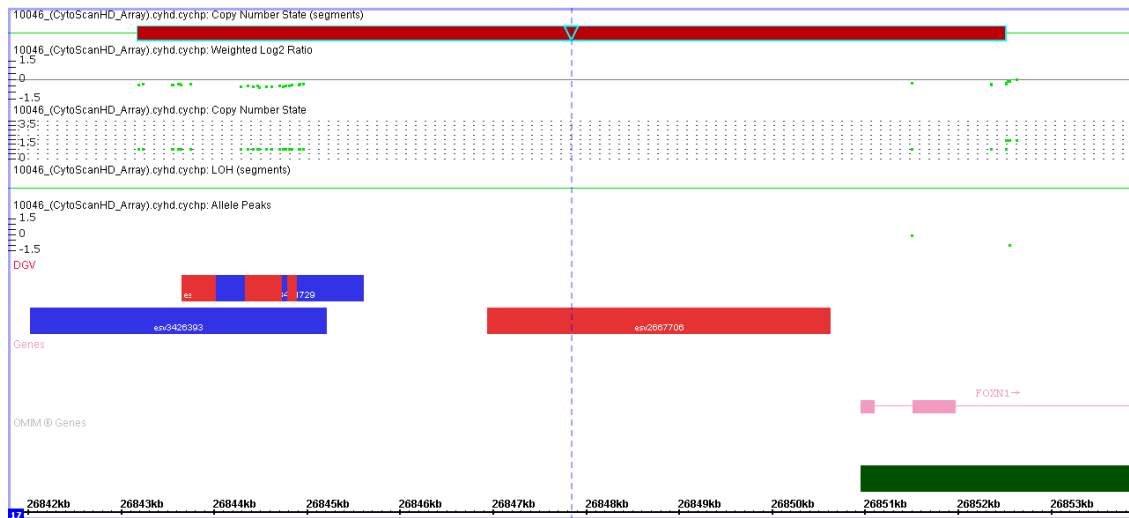
O paciente 10 (Figura 28), com 4 meses, apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, especialmente na fala e algumas dismorfias: bossa occipital, fendas palpebrais estreitas, raiz nasal baixa, boca em tenda, orelhas de implantação baixa, retrognatia e fenda palatina.



**Figura 28. Paciente 10. Paciente com bossa occipital, fendas palpebrais estreitas, raiz nasal baixa, boca em tenda e retrognatia**

A análise por *microarray* desse paciente mostrou uma deleção pequena de apenas 9Kb, arr(Hg19) 17q11.2(26,843,187-26,852,518)x1, em uma das cópias do gene *FOXN1*(Figura 29). Os pais não são portadores da alteração. O gene *FOXN1* (*Forkhead-class transcription factor*) codifica um fator de transcrição que regula o desenvolvimento, diferenciação e função das células tímicas epiteliais no timo pré e pós natal (Shakib, 2009; Su, 2003). Deleção do *FOXN1* na células epiteliais tímicas, resultam em formação de cistos no timo,

perda da arquitetura tridimensional do timo e redução do número de células CD4+ e CD8+ maduras (Guo, 2011).

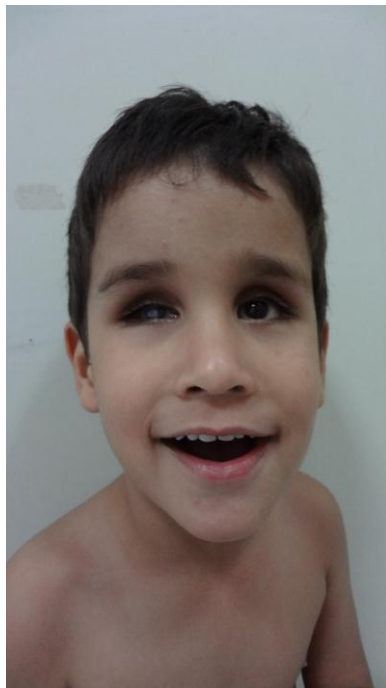


**Figura 29.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(Hg19) 17q11.2(26,843,187-26,852,518)x1 que inclui parte do gene *FOXN1*.

O gene *FOXN1* é reponsável pelo fenótipo Nude em ratos. Determina imunodeficiência combinada grave (SCID), causada por um defeito intrínseco do timo, associado à alopecia congênita e distrofia ungueal. Foi reportado um caso de um feto com fenótipo Nude/ SCID que apresentava defeito de tubo neural (anencefalia e espinha bífida). Posteriormente foi relatado outro feto de 16 semanas com fenótipo Nude/SCID que apresentava defeito de septo pelúcido, agenesia de corpo caloso e alargamento da fissura inter-hemisférica. Esses casos sugerem que alterações no gene *FOXN1* possam interferir no desenvolvimento do sistema nervoso central, assim como as outras proteínas da família FOX (Amorosi, 2010). Por ser uma alteração muito pequena, a consideramos como possivelmente patogênica. As análises por *microarray* dos pais dos pacientes foram normais.

### **Paciente 11**

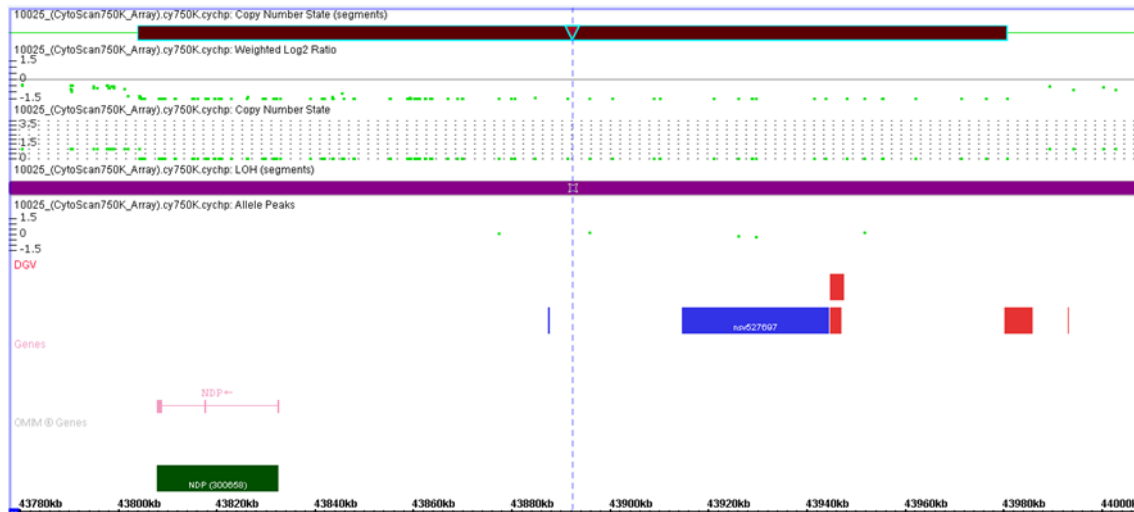
O paciente 11 (Figura 30), 3 anos apresentava dificuldade de aprendizado, hipotelorismo ocular, microftalmia e leucocoria à direita, ausência de reflexo fotomotor bilateral, testículo ectópico à direita, mecha de cabelo branco em frente. Ressonância magnética dos olhos: descolamento da retina bilateral. Persistência hiperplásica do vítreo primitivo bilateralmente. Ressonância magnética do crânio normal. Ecocardiograma normal.



**Figura 30. Paciente 11. Esse paciente com microftalmia à direita.**

Esse paciente tem uma deleção de cerca de 170 kb no braço curto do cromossomo X,  $arr(hg19)Xp11.3 (43,804,248-43,980,814)x1$  (Figura 31), que inclui o gene NDP, responsável pela síndrome de Norrie. A síndrome de Norrie é uma doença recessiva ligada ao X, caracterizada por cegueira muito precoce na infância devido a alterações degenerativas e proliferativas da neuroretina (pseudogliomas). As alterações oculares encontradas são: catarata, atrofia da íris, sinéquia da íris anterior e posterior, aumento da pressão intra-ocular. Aproximadamente 50% dos pacientes com essa síndrome apresentam alguma forma de doença mental progressiva, frequentemente com características

psicóticas e aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolvem surdez neurossensorial na segunda década. Pode haver doença vascular periférica, incluindo hipertensão pulmonar. Alguns pacientes têm fenótipo complexo, incluindo falência de crescimento e convulsão (Sims, 2014).



**Figura 31.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado,  $\text{arr}(\text{hg}19)\text{Xp}11.3(43,804,248-43,980,814)\times 1$ , que abrange o gene NDP responsável pela síndrome de Norrie.

O gene *NDP* é pequeno e possui 3 éxons. Os éxons 2 e 3 têm uma matriz de leitura de cerca de 399bp, que codifica uma proteína de 133 aminoácidos com estrutura tridimensional semelhante a várias neutrofinas ricas em cisteínas, como fatores de crescimento neuronal (Meitinger, 1993). Assim pode-se inferir que a proteína NDP é um elemento essencial no desenvolvimento neuronal e retiniano.

A mãe do paciente não é portadora da deleção.

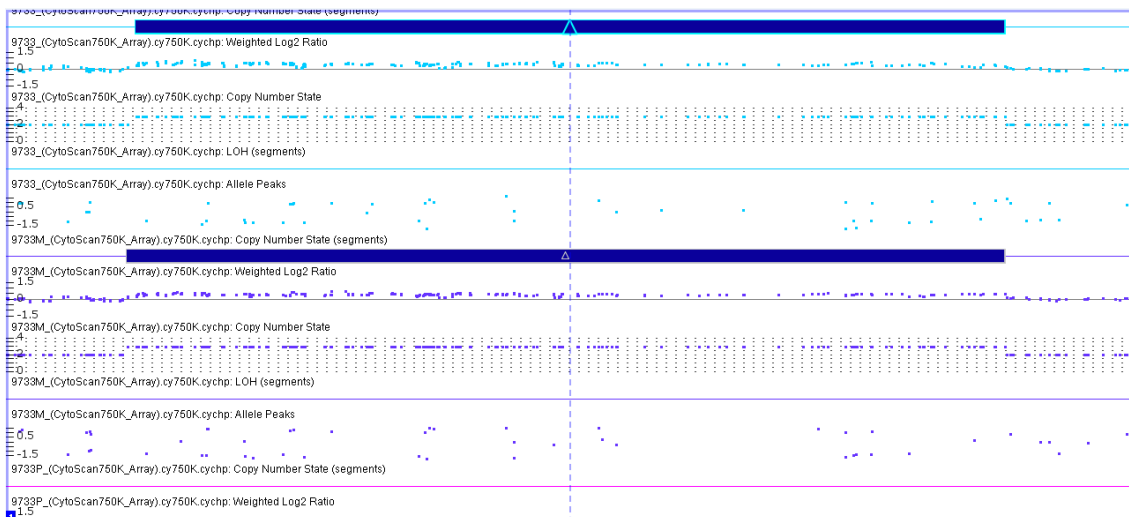
### **Paciente 12**

O paciente 12 (Figura 32), com 1 ano, tinha atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, especialmente na fala, epicanto bilateral, fendas palpebrais oblíquas ascendentes, filtro longo e liso, lábio superior fino, boca em carpa, prega transversal em mão esquerda, duas pregas transversais unidas por uma prega vertical em mão direita, quinto dedo curto bilateral, prega de flexão única no quinto dedo à direita (Figura 32). Ecocardiograma: comunicação interatrial tipo *ostium secundum*, medindo 10.5 mm, com fluxo átrio esquerdo >átrio direito. Ecografia de abdome normal. Avaliação oftalmológica normal.

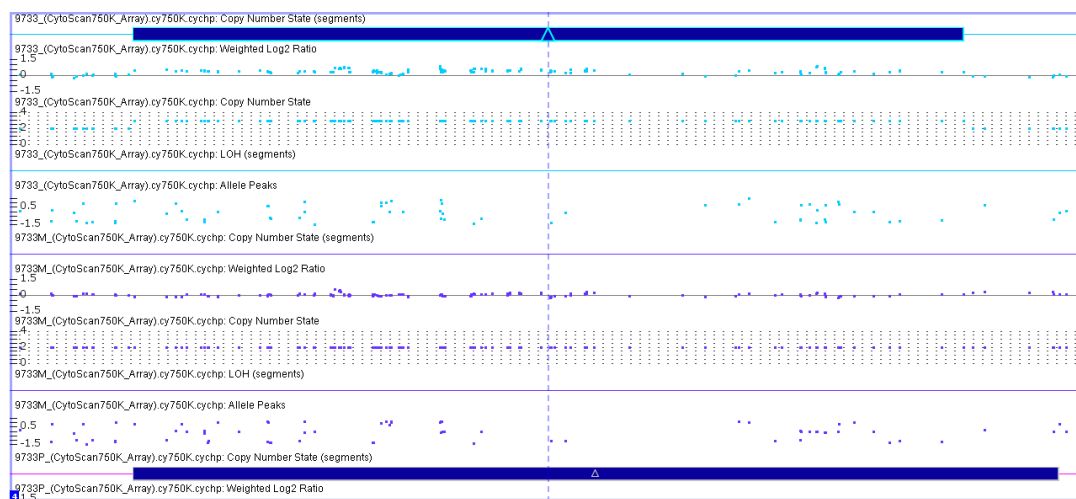


**Figura 32. Paciente 12. Paciente apresenta epicanto bilateral, fendas palpebrais discretamente oblíquas ascendentes, columela curta, filtro naso-labial longo e bem marcado, lábio superior fino.**

A análise por *microarray* mostrou que paciente tem dup 1p, arr(hg19) 1p31.3 (61,704,029-62,125,291)x3, herdada da mãe saudável (Figura 33) e uma duplicação 4q, arr(h19)4q35.2(189,989,988-190,367,324)x3, que não tem significado patogênico e foi herdada do pai (Figura 34). As alterações encontradas no paciente não têm, portanto, significado patogênico conhecido.



**Figura 33.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19) 1p31.3 (61,704,029-62,125,291)x3, herdado da mãe saudável.



**Figura 34.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix®). O retângulo azul representa o segmento duplicado. Arr(h19)4q35.2(189,989,988-190,367,324)x3, herdada do pai saudável.



### **Paciente 13**

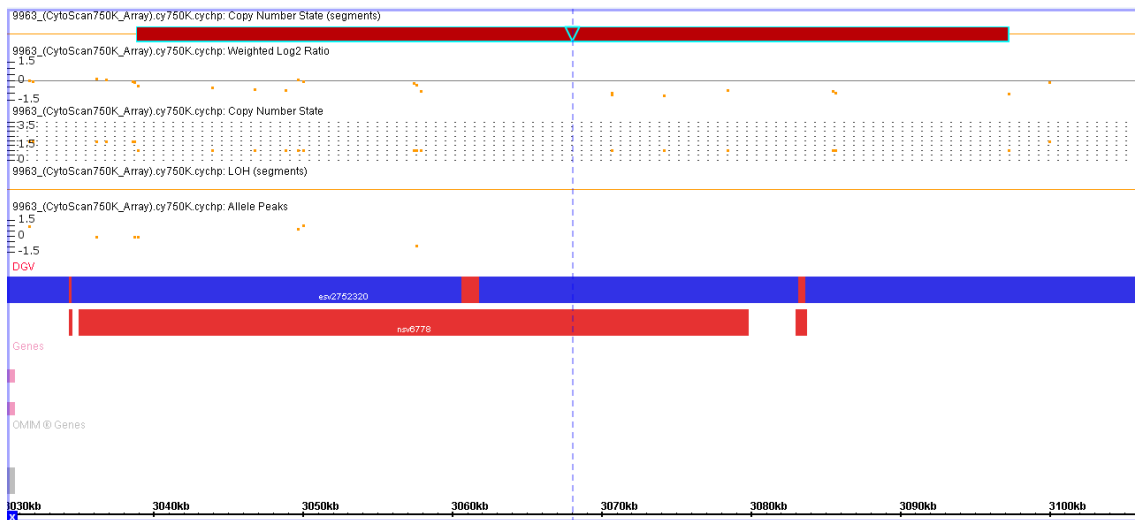
A paciente 13 (Figura 35), 17 anos, apresentava dificuldade de aprendizado, face arredondada, baixa estatura, mesomelia, deformidade de Madelung no punho (encurtamento e arqueamento de rádio com subluxação dorsal da ulna distal). Ressonância magnética evidenciava focos de hipersinal T2/ Flair na substância branca subcortical do lobo frontal esquerdo e na região periventricular ipsilateral.



**Figura 35. Paciente 13 .Face arredondada, baixa estatura, mesomelia, deformidade de Madelung.**

A análise por *microarray* evidenciou deleção na região Xp, arr(hg19)Xp22.3(3,038,936-3,097,257)x1(Figura 36), que inclui o gene *SHOX*.

A haploinsuficiência do *SHOX* é encontrada em pacientes com baixa estatura idiopática e sindrômica (Turner, Discondrosteose de Leri-Weil, displasia de Langer) (Belin, 1998) e afeta ambos os sexos. Desenvolvimento puberal e fertilidade são normais. As características clínicas incluem baixa estatura, mesomelia em membros superiores e inferiores e deformidade de Madelung. É indicada a terapia com hormônio do crescimento (Blinder,2011).



**Figura 36. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19)Xp22.3(3,038,936-3,097,257)x1, que inclui gene *SHOX*.**

### **Paciente 14**

O paciente 14 (Figura 37), com 1 ano e 8 meses, tinha atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, edema periorbital bilateral, epicanto bilateral, narinas amplas, palato ogival, hipoplasia de face média, orelhas de implantação baixa, pele marmorata, prega palmar transversal em mão esquerda e de transição em mão direita e bolsas testiculares hipoplásicas. Tomografia computadorizada de crânio: assimetria entre os hemisférios cerebelares, menor à esquerda, acompanhado de alargamento da cisterna magna.



**Figura 37. Paciente 14. Apresenta epicanto bilateral, edema periorbital bilateral, estrabismo convergente, hipoplasia de face média, orelhas de implantação baixa, narinas amplas.**

A análise por *microarray* desse paciente mostrou dup 2p, arr(hg19)2p16.1 (55,449,572-55,914,876)x3 ( Figura 38) de cerca de 450 Kb e dup 4q, arr(hg19)4q22.3(99,761,769-99,938,226)x3 de 170 kb (Figura 39).Apenas a mãe foi investigada por *microarray* e não era portadora das alterações. A duplicação 2p16.1 tem significado incerto. Essa região abrange o gene *SMEK2*(*MEK1 Supressor 2*), que é expresso em vários tecidos humanos incluindo alguns tecidos cerebrais. A região da deleção 4q22.3 inclui o gene *EFI4E* (*Eukaryotic translation initiation factor*), que é um fator de iniciação da tradução envolvido no direcionamento dos ribossomos às estruturas *cap* dos

RNAs mensageiros. Essa região é descrita como envolvida na suscetibilidade ao autismo (OMIM#133440).

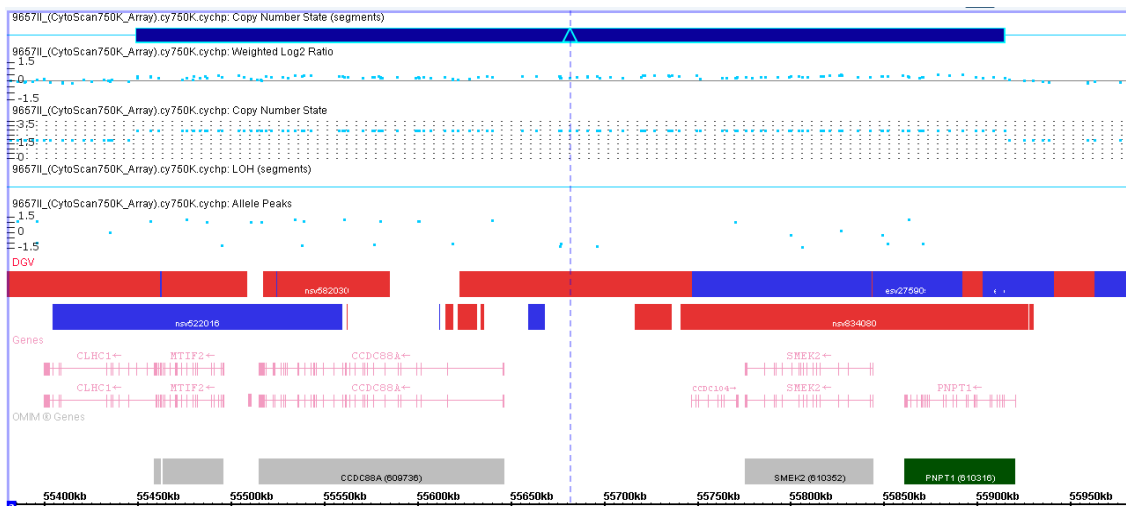


Figura 38. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul representa o segmento duplicado, arr(hg19)2p16.1 (55,449,572-55,914,876)x3.

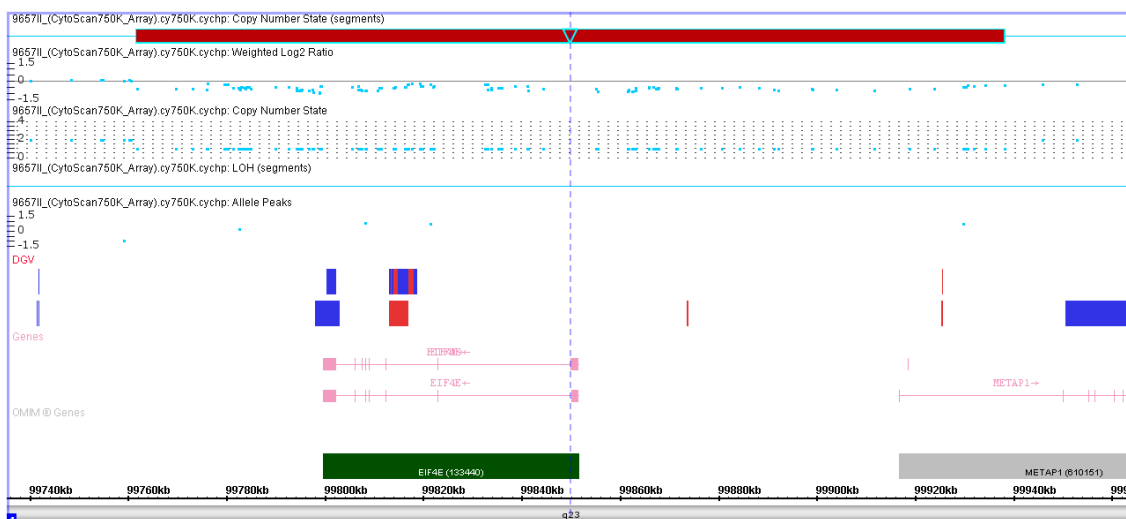


Figura 39. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19) 4q22.3(99,761,769-99,938,226)x3.

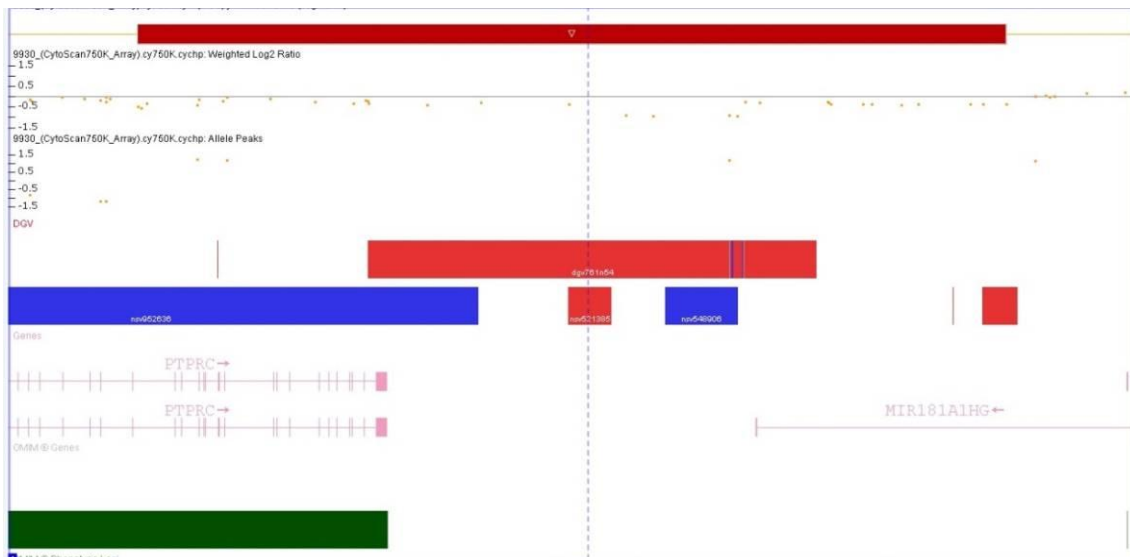
### **Paciente 15**

A paciente 15 (Figura 40), com 6 anos, apresentava discreta assimetria facial, estrabismo convergente de olho esquerdo, orelhas em abano, clinodactilia de quintos quirodáctilos, dificuldade de aprendizado, agitação neuropsicomotora, distúrbio de comportamento como repetição de palavras, *flapping* de mãos e agressividade.



**Figura 40. Paciente 15. Essa paciente apresenta assimetria facial, estrabismo convergente**

Essa paciente possui pequena deleção no braço longo do cromossomo 1 (1.2Mb),  $arr(hg19)1p31.3(198,692,363-198,811,422)x1$  (Figura 41), que abrange o gene *PTPRC* (*Protein-Tyrosine Phosphatase Receptor-Type C*).



**Figura 41. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado. Arr(hg19)1p31.3(198,692,363-198,811,422)x1, que inclui parte do gene *PTPRC*.**

O gene *PTPRC* codifica a proteína CD45 presente na membrana dos leucócitos, especialmente linfócitos T, B e células Killer. Haploinsuficiência desse gene está relacionada a imunodeficiência. Não há relato de deficiência intelectual associada a esse gene (OMIM#151460).

### **Paciente 16**

O paciente 16 (Figura 42), com 4 anos, tinha fendas palpebrais pequenas, dorso nasal elevado, palato alto, microrretrognatia, sobredobramento de hélices, orelhas pequenas, dedos longos, clinodactilia de quintos pododáctilos (Figura 42). Ecocardiograma normal.



**Figura 42. Paciente 16. Paciente apresenta fendas palpebrais estreitas, dorso nasal elevado, microrretrognatia.**

Esse paciente tem uma deleção 22q de 3,5 Mb, arr(hg19)22q11.21(18,638,855-21,800,471)x1 (Figura 43), que determina a síndrome Velocardiofacial/ Di George, uma síndrome de microdeleção relativamente frequente, com incidência estimada de 1/4000 nascidos vivos. Essa síndrome envolve várias alterações clínicas, incluindo cardiopatia congênita, anormalidades de palato, imunodeficiência, disfagia e anomalias renais. Em 90% dos pacientes com essa síndrome há deficiência intelectual. (OMIM#192430). O paciente não apresenta alteração cardíaca, um achado usual nessa síndrome.

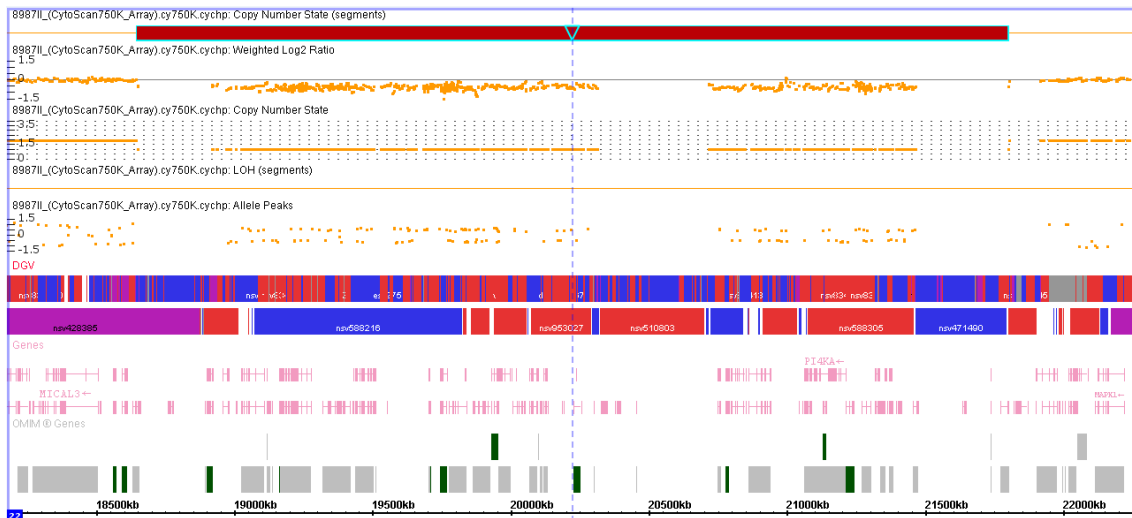


Figura 43. Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19)22q11.21(18,638,855-21,800,471)x1, correspondente à região da síndrome Velocardiofacial/ Di George.



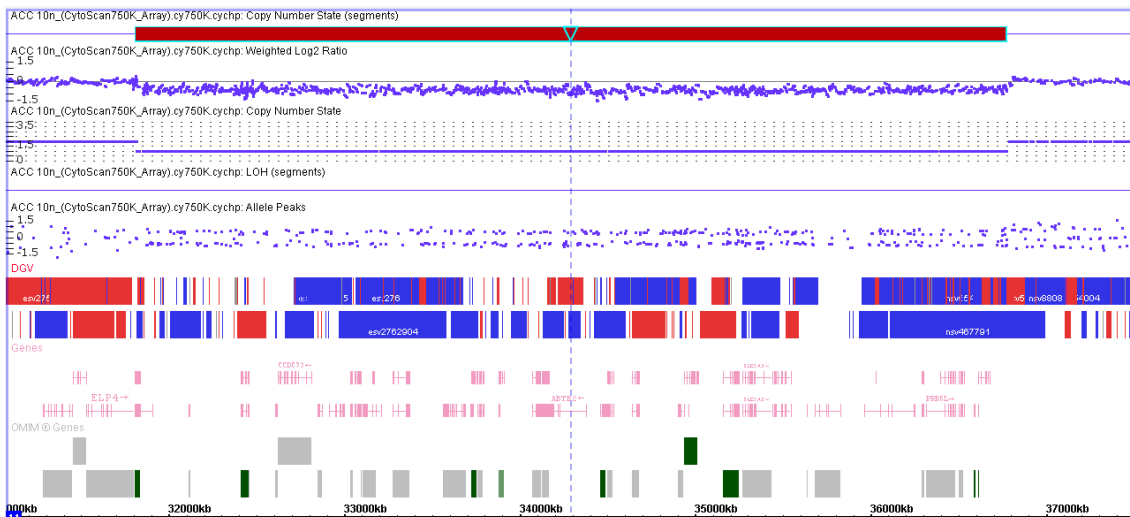
### **Paciente 17**

A paciente 17 (Figura 44), com 1 ano de idade, possuía as seguintes características: microbraquicefalia, hipertelorismo ocular, orelhas com baixa implantação, hipoplasia de face média, raiz nasal baixa, narinas antevertidas, dentes pequenos, com perdas em face oclusal, fenda palatina pós-forame incisivo, úvula bífida, pescoço algo encurtado, hérnia umbilical, hiperconvexidade de unhas de mãos e pés e hipertrofia de clitóris. A paciente tinha atraso neuropsicomotor significativo, alimentava-se por sonda naso-entérica. Ecocardiograma: *ductus* arterioso, forame oval patente e efusão pericárdica. Ecografia de abdome: rins policísticos e poliesplenia. Tomografia computadorizada de crânio: leucomalácia, afilamento de corpo caloso e dilatação ventricular.



**Figura 44. Paciente17. Essa paciente apresenta braquimicrocefalia, hipertelorismo ocular, hipoplasia de face média, raiz nasal baixa, narinas antevertidas.**

A paciente apresenta deleção 11p13-11p12, arr(hg19) 11p13-11p12(31,813,872-36,773,780)x1 (Figura 45) que abrange cerca de 42 genes, sendo mais relevantes o *PAX6* e o *WT1*. Microdeleção 11p13 é associada à síndrome WAGR que inclui tumor de Wilms, aniridia, malformações geniturinárias, deficiência intelectual.



**Figura 45.**Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19) 11p13-11p12((31,813,872-36,773,780)x1, que inclui os genes *PAX6* e *WT1*.

Deleção do *PAX6* (*paired Box gene 6*) resulta em aniridia e outras anormalidades oculares. Esse gene codifica um fator transcriptional que controla o desenvolvimento do tronco cerebral, pâncreas e tecidos oculares, incluindo epitélio corneal, cristalino e retina (Georgala, 2011). Cerca de 300 mutações do *PAX6* causam diferentes fenótipos com ganho ou perda de função como aniridia, catarata, distrofia corneana, coloboma ocular, coloboma do nervo óptico, hiperplasia foveal, anomalia de Peter's, queratite e hipoplasia de nervo óptico (D'Élia, 2007). Apesar da paciente ter grande parte do *PAX6* deletado, ela não apresenta alterações oftalmológicas.

O *WT1* (*Wilms tumor 1*) codifica um fator de transcrição da família *zinc finger*. que tem função no desenvolvimento e diferenciação renal. Alterações nesses genes podem ser encontradas em 10-15% dos tumores de Wilms e câncer renal infantil (Hastie, 1994; Hunff 1998). A deleção do *WT1* pode ocasionar anormalidades genitais, acarretando diferentes fenótipos genéticos como WAGR, Denys-Drash e Frasier. A paciente em questão teve tumor de Wilms diagnosticado aos 6 meses de vida.

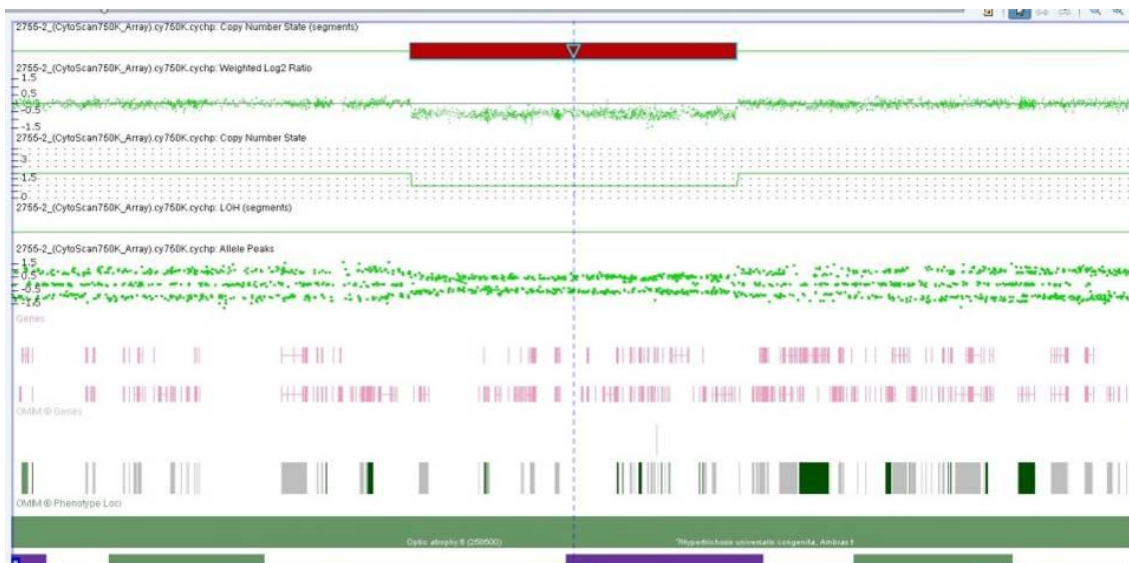
### **Paciente 18**

O paciente 18 (Figura 46), com 16 anos, apresentava deficiência intelectual, fronte em quilha, implantação baixa de cabelos na fronte e nuca, sobrancelhas grossas, arqueadas e desorganizadas, epicanto bilateral, blefarofimose bilateral, hipertelorismo ocular, raiz nasal baixa, ponta do nariz com sulco mediano, columela curta, narinas antevértidas, filtro longo com sulco apagado, boca pequena, lábio superior fino, orelhas de implantação baixa, hipoplasia do lobo auricular bilateral, hipoplasia da face média, pescoço curto, pé-torto congênito redutível.



**Figura 46. Paciente 18. Blefarofimose, sobrancelhas grossas, narinas antevértidas, hipoplasia de face média, filtro naso-labial longo e apagado, lábio superior fino..**

A análise por *microarray* desse paciente mostrou deleção 8q21.3-22.1, arr(hg19)8q21.3-22.1(88,826,517-98,221,726)x1 (Figura 47). Esta região corresponde a um conjunto de genes que contribuem para um fenótipo único que corresponde à síndrome da máscara de Nablus (OMIM#608156). Além da deficiência intelectual, as características dessa síndrome incluem: pele facial brilhante, implantação alta de cabelos na fronte, fendas palpebrais pequenas, blefarofimose, aparente hipertelorismo ocular, sobrancelhas esparsas, lábio superior evertido e configuração anormal da orelha (Shieh, 2006).

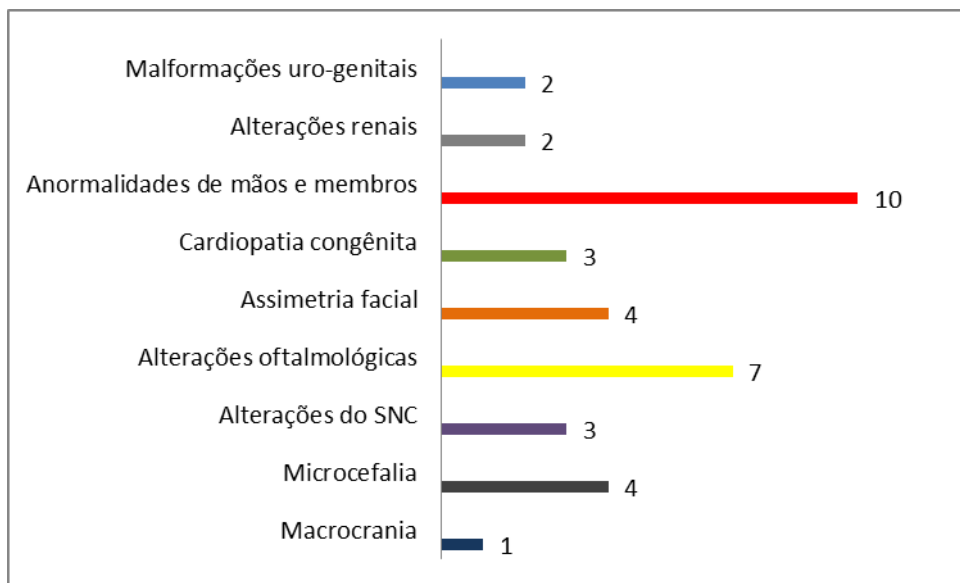


**Figura 47.** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado, arr(hg19)8q21.3-22.1(88,826,517-98,221,726)x1,correspondente à síndrome de Nablus.

A síndrome de Nablus é uma condição única, descrita primeiramente por Pashayan et al em 1973. Em 1983, Riviera et al, relatou o caso de um menino com deleção 8q21.2-8q22 que apresentava hipotonia e malformações menores e não tinham as características da síndrome de Nablus. Em 1995, Donahue and Ryan descreveram uma menina com uma deleção maior (8q21.3-8q22.1) que apresentava defeito de septo ventricular e variante de Dandy-Walker, além das dismorfias menores. O paciente possui implantação baixa de cabelos na fronte, blefarofimose, hipertelorismo ocular compatíveis com essa síndrome. A alteração desse paciente não foi herdada dos pais.

Em nossa amostra observamos uma grande variedade de dados clínicos nos pacientes com alterações na análise cromossômica por *microarray*.

Dentre as características mais frequentemente apresentadas pelos pacientes da nossa amostra destacam-se as alterações de mãos e membros (10), seguida por alterações oftalmológicas (7) (Figura 48).



**Figura 48. Principais características dos pacientes analisados com alterações detectadas pelo CMA e o número de portadores desses sinais clínicos em nossa amostra.**

O presente trabalho corrobora o CMA como uma ferramenta poderosa para identificar desequilíbrios cromossômicos, não detectáveis pelo cariótipo, caracterizando a etiologia genética em pacientes com deficiência intelectual e dismorfias

Na nossa casuística de 50 pacientes com deficiência intelectual e dismorfias/ malformações, foram identificados CNVs sabidamente patogênicos e de significado incerto em 18 pacientes (36%). Destes, 11 (22%) apresentaram alterações classificadas como patogênicas, 1 (2%) possivelmente patogênica, 1 (2%) possivelmente benigna e 5 (10%) variantes de significado incerto (VOUS).

Se considerarmos o número total de alterações, a porcentagem de detecção aumentada no nosso estudo pode ser explicada por uma seleção mais apurada dos pacientes que apresentavam desvios fenotípicos bem evidentes, além do atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual. É comparável ao estudo de Aradhya et al, em 2010, nos Estados Unidos que foram selecionados 20 pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual, dismorfias/ malformações em que foi

possível diagnosticar 35% dos casos. Mesmo se considerarmos apenas as alterações classificadas como patogênicas ainda temos uma detecção de 22% o que é comparável com os estudos anteriores que apresentaram maior frequência de alterações (Tabela 2, Introdução)

Em 5 pacientes com alterações patogênicas, os CNVs estão relacionados com síndromes genéticas já descritas catalogadas no OMIM, entre elas as síndromes de microdeleção Williams-Beuren e Velocardiofacial/DiGeorge, que são relativamente comuns, e as síndromes de Axenfeld- Rieger, Norrie e Nablus, que são muito raras. Os outros 6 casos foram classificados como patogênicos pelo tamanho da alteração e correlação entre o conteúdo gênico e fenótipo dos afetados. Dois pacientes tiveram CNVs herdados dos pais fenotipicamente normais e foram classificados como possivelmente benignos. Um paciente teve uma deleção *de novo* de apenas 9kb e por isso foi classificada como possivelmente patogênica.

Estudos sugerem que a maioria dos CNVs não são recorrentes. A determinação do significado clínico dos CNVs é um desafio. Apesar do CMA oferecer uma sensibilidade e alta-resolução em detectar CNVs por todo o genoma, a interpretação das variantes de significado incerto é uma responsabilidade grande para clínicos e laboratórios (Itsara, 2009). Alguns bancos de dados como DECIPHER (*DataBase of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources*) and DGV (*Database of Genomics Variants*), que são constantemente expandidos pela comunidade científica, provêm informações relevantes para correlacionar o fenótipo com o genótipo (Caramashi, 2014).

O cariótipo com bandeamento G é uma técnica que está disponível há 38 anos como exame de primeira linha para detectar desequilíbrios genéticos na população que podem cursar com deficiência intelectual e distúrbios e tem como vantagem ser uma técnica amplamente acessível e uniforme que segue a um sistema internacional de nomenclatura citogenética (ISCN). Em contraste o CMA é uma técnica nova e mais diversificada em termos de técnicas, cobertura do genoma e interpretação dos resultados. Superar a escassez de uniformidade irá permitir aumentar a sensibilidade e especificidade do CMA em

detectar desequilíbrios cromossômicos em uma resolução mais alta e menos subjetividade do cenário clínico. Além disso, delinear mais precisamente as deleções e duplicações possibilita identificar os genes contidos nessas áreas, permitindo a correlação destes com a presença de doença.

O cariótipo tradicional diagnostica cerca de 5% dos casos de deficiência intelectual. O CMA consegue diagnosticar ao menos 10-20% dos casos, a depender da plataforma do *microarray*, cobertura, tamanho da sonda, assim como do espectro fenotípico dos pacientes. Em nossa amostra detectamos alterações sabidamente patogênicas em 22% dos casos, o que é compatível com outros estudos.

No nosso trabalho dos 20 CNVs encontrados, 14 ( 70%) são deleções e 6 (30%) duplicações. Em um estudo feito por Caramaschi et al, em 2014, 85% dos CNVs encontrados eram deleções. O número de deleções bem maior que de duplicações confirma a idéia de que a haploinsuficiência é menos tolerada que o aumento de dose no genoma humano (Brewer, 1999).

Apesar do custo progressivamente decrescente, o *array*, ainda é um exame caro e trabalhoso, assim é conveniente que a análise seja realizada em pacientes bem selecionados. Alguns trabalhos evidenciam que a presença de CNVs patogênicos estão relacionados com um quadro clínico significativo ou com expressão pleiotrófica da doença. Outros estudos têm demonstrado que a presença de pelo menos 2 características clínicas aumentam a chance do fenótipo estar associado com os CNVs, entretanto algumas exceções existem, o que é explicado pela heterogeneidade das desordens genéticas. Assim é importante a caracterização fenotípica completa dos pacientes que serão submetidos à análise por *microarray* a fim de obter melhores resultados.

A maioria dos CNVs associados com deficiência intelectual são esporádicos, mas alguns podem ser herdados com risco de recorrência em torno de 50%. É necessário testar os pais dos pacientes tanto para avaliar se os CNVs são herdados, quanto para determinar se o ponto de quebra é ou não similar aos dos pais. Quando a síndrome tem alta penetrância é mais fácil de reconhecer pela história clínica e exame clínico, mas as síndromes com penetrância incompleta são mais difíceis de serem diagnosticadas, uma vez

que os pais aparentemente saudáveis ou com deficiência intelectual leve podem ser negligenciados pelo fato da avaliação ser focada na criança.

Há uma discussão ética em torno do CMA por permitir identificar consanguinidade, incesto e falsa paternidade não suspeitados e se esses resultados forem reportados podem ter implicações legais.

O uso da análise por *microarray* nos ensaios clínicos têm demonstrado melhorar o seguimento, estratégias de reabilitação e, em casos selecionados, terapia profilática em pacientes com a presença de CNVs patogênicos. Em 2011, Coulter et al, demonstrou em uma Cohort de 1792 pacientes com deficiência intelectual, desordens do espectro autista e malformações congênicas foram realizadas recomendações terapêuticas em 54% pacientes com resultados da análise por *microarray* clinicamente significativos. Ellison et al , em 2012, encontrou que 35% dos casos com resultados positivos do CMA são síndromes de microdeleção e microduplicação que aumentam o risco de câncer ou outras condições associadas a alterações dose-sensitiva dos gene. Riggs et al, em 2014, elaborou uma lista com 146 desordens genômicas que podem ser detectadas pelo CMA para as quais haviam evidências publicadas de recomendações de suporte e tratamento e identificou que 7% dos casos do banco de dados do consórcio da ISCA (*International Standarts for Cytogenomic Arrays*) podiam ter intervenções. Tao et al, em 2014, demonstrou que influenciou o manejo clínico de 75% dos pacientes com resultados significativos pela CMA.

Nos outros países do mundo é crescente a demanda de geneticistas, neurologistas e pediatras em solicitar CMA para o diagnóstico de deficiência intelectual. Um diagnóstico genético específico é importante para facilitar os cuidados médicos e aconselhamento do risco familiar. No Brasil, como no resto do mundo, é cada vez mais crescente essa necessidade.



## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu para a identificação da causa genética de pacientes com deficiência intelectual sindrômica pela análise cromossômica por microarray.

A taxa de detecção de alterações foi de 36%(18/50) sendo esse valor acima da média encontrada na literatura, possivelmente pela seleção da amostra. No entanto o percentual de alterações efetivas, relacionadas com o quadro clínico apresentado pelos pacientes foi de 22%, que está de acordo com o que é realizado em outros locais do mundo.

Todos os pacientes analisados apresentam quadro sindrômico e alguns apresentaram alterações características de síndromes específicas, sem que tivesse havido suspeita clínica. previamente ao exame. A descrição de novos pacientes com essas síndromes pode contribuir para a melhor caracterização das mesmas de modo a facilitar o diagnóstico clínico.

Além da deficiência intelectual ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, os pacientes com resultado positivo apresentaram frequentemente alterações de mãos e membros e alterações oftalmológicas. Esses dados podem sugerir a indicação da realização da análise cromossômica por microarray nesses pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorosi S, Vigliano I, Del Giudice E, Panico L, Maruotti GM et al. Brain alteration in a Nude/SCID fetus carrying FOXP1 homozygous mutation. *J Neurol Sci.* 2010 Nov 15;298(1-2):121-3.

Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 2007;143A:1431–1441.

Akbarian S. The neurobiology of Rett syndrome. *Neuroscientist.* 2003;9(1):57-63.

Aston E, Whitby H, Maxwell T, Glaus N, Cowley B, Lowry D, et al. Comparison of targeted and whole genome analysis of postnatal specimens using a commercially available array based comparative genomic hybridisation (aCGH) microarray platform. *J. Med. Genet.* 2008 45, 268–274.

Balciuniene J, Feng N, Iyadurai K, Hirsch B, Charnas L et al. Recurrent 10q22-q23 deletions: a genomic disorder on 10q associated with cognitive and behavioral abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2007 May;80(5):938-47.

Baldwin E L, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet. Med.* 2008.10, 415–429.

Ballif BC, Rorem EA., Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. 2006. *Am. J. Med. Genet. A.* 140,2757–2767.

Barateiro A, Vaz AR, Silva SL, Fernandes A, Brites D. ER stress, mitochondrial dysfunction and calpain/JNK activation are involved in oligodendrocyte precursor cell death by unconjugated bilirubin. *Neuromolecular Med.* 2012, 14:285–302.

Baris HN, TanWH., Kimonis VE, Irons M B. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization in a clinical setting. *Am. J. Med. Genet.* 2007.A.143A, 2523–2533.

Bartnik M, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska B, Smyk M, Kędzior M et al. The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children. *Dev Period Med.* 2014 Jul-Sep;18(3):307-17.

Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V: SHOX mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). *Nat Genet.* 1998, 19:67–69.

Bennett RL, Motulsky AG, Bittles A, Hudgins L, Uhrich S, et al. Genetic counseling and screening of consanguineous couples and their offspring: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.*2011, 11:97–119.

Bertelsen B, Melchior L, Jensen LR, Groth C, Glenthøj B, Rizzo R, Debes NM, Skov L, Brøndum-Nielsen K, Paschou P, Silaharoglu A, Tümer Z: Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the *IMMP2L* gene in patients with Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet.*2014, 19:1–7.

Black G, Redmond RM .The molecular biology of norrie's disease. *Eye.*1994;8, 491-496.

Blinder G: Short stature due to *SHOX* deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm Res Paediatr .*2011, 75:81–89.

Bourgeois P1, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K et al. The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998 Jun;7(6):945-57.

Boycott KM, Parslow MI, Ross JL, Miller IP, Bech-Hansen NT, et al. A familial contiguous gene deletion syndrome at Xp22.3 characterized by severe learning disabilities and ADHD.*Am J Med Genet A.*2003 Oct 1;122A(2):139-47.

Branchi I, Bichler Z, Berger-Sweeney J, Ricceri L. Animal models of mental retardation: from gene to cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003 Jan-Mar;27(1-2):141-53.

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality—and tolerance of segmental aneuploidy—in humans. *Am J Hum Genet* 1999, 64(6):1702–1708.

Busch M, Leube B, Thiel A, Schanze I, Beier M, Royer-Pokora B. Evaluation of chromosome 11p imbalances in aniridia and Wilms tumor patients.*Am J Med Genet A.* 2013;161A(5):958-64.

Caramaschi E, Stanghellini I, Magini P, Giuffrida MG, Scullin S et al. Predictive diagnostic value for the clinical features accompanying intellectual disability in children with pathogenic copy number variations: a multivariate analysis. *Italian Journal of Pediatrics.* 2014, 40:39.

Chechlac M, Gleeson JG. Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatr Neurol.* 2003;29(1):11-17. *NeurosciBiobehav Rev.* 2003;27:141-53.

Chen ZF1, Behringer RR. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev.* 1995 Mar 15;9(6):686-99.

Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome.*J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20:1634–1640.

Christian SL, Paciorkowski AR, Marini C, Guerrini R, Maltsev N et al. Copy number variants and infantile spasms: evidence for abnormalities in ventral forebrain development and pathways of synaptic function. *Eur J Hum Genet.* 2011 Dec;19(12):1238-45

Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, Hawley P, Picker J et al. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet Med.* 2011 Sep;13(9):770-6.

Dahdaleh FS, Carr JC, Calva D, Howe JR. MD Juvenile polyposis and other intestinal polyposis syndromes with microdeletions of chromosome 10q22-23. *Clin Genet.* 2012 February ; 81(2): 110–116.

Decouflé P, Boyle CA, Paulozzi LJ, Lary JM. Increased risk for developmental disabilities in children who have major birth defects: a population-based study. *Pediatrics.* 2001;108(3):728-34.

D'Elia AV, Pellizzari L, Fabbro D, Pianta A, Divizia MT et al. A deletion 3' to the PAX6 gene in familial aniridia cases. *Mol Vis.* 2007. 13: 1245-1250.

De Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012; 367;20

De Vries BBA, Pfundt R, Leisink M. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:606 – 616

Durkin M: The epidemiology of developmental disabilities in low-income countries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002, 8(3):206-211.

El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, et al. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet.* 1997.15:42–46.

Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Robey PG, Laig-Webster M, et al. A candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997, 6:1341–1347.

Ellison JW, Ravnan JB, Rosenfeld JA, Morton SA, Neill NJ et al. Clinical utility of chromosomal microarray analysis. *Pediatrics.* 2012 Nov;130(5):e1085-95.

Engels H, Brockschmidt A, Hoischen A, Landwehr C, Bosse K, et al. DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology.* 2007. 68, 743–750

Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genome wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum. Mutat.* 2007. 28, 1124–1132.

Fombonne E. The changing epidemiology of autism. *J Appl Res Intellect Disabil.*2005, 18:281–294.

Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L , et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am. J. Hum.Genet.* 2006;79, 500–513.

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, et al. Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2008;82:432–443.

Gatta V, Antonucci I, Morizio E, Palka C, Fischetto R, Mokini V, Tumini S, Calabrese G, Stuppia L: Identification and characterization of different SHOX gene deletions in patients with Léri-Weill dyschondrosteosys by MLPA assay. *J Hum Genet* 2007, 52:21–27.

Georgala PA, Carr CB, Price DJ. The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol.*2011 71(8): 690-709. 21538923.

Gimelli S , Capra V, Di Rocco M, Leoni M, Mirabelli-Badenier M, et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Molecular Cytogenetics.* 2014, 7:54.

Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet* 2011, 7(11):e1002334.

Girirajan S, Johnson RL, Tassone F, Balciuniene J, Katiyar N et al. Global increases in both common and rare copy number load associated with autism. *Hum Mol Genet* 2013, 22(14):2870–2880.

Goitia V, Oquendo M , Stratton R. Case of 7p22.1 Microduplication Detected by Whole Genome Microarray (REVEAL) in Workup of Child Diagnosed with Autism. Hindawi Publishing Corporation *Case Reports in Genetics* . 2015, Article ID 212436.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 2012, 367(14):1321–1331.

Guo H, Daí L, Huang Y, Liao Q, Bai Y. A Large Novel Deletion Downstream of *PAX6* Gene in a Chinese Family with Ocular Coloboma. *PLOS ONE.* December 2013. Volume 8. Issue 12. e83073.

Guo J, Rahman M, Cheng L, Zhang S, Tvinnereim A, et al. Morphogenesis and maintenance of the 3D thymic medulla and prevention of nude skin phenotype require FoxN1 in pre- and post-natal K14 epithelium. *J Mol Med.*2011; 89: 263–277].

Haidle, JL.; Howe, JR. Juvenile Polyposis Syndrome. Vol. Vol. 2011. 2011.

Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet.* 1994;28:523-58

Huff V. Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet.* 1998 ;79(4):260-7

Hehir-Kwa JY, Egmont-Petersen M, Janssen IM, Smeets D, van Kessel AG, Veltman JA. Genome-wide copy number profiling on high-density bacterial artificial chromosomes, single-nucleotide polymorphisms, and oligonucleotide microarrays: a platform comparison based on statistical power analysis. *DNA Res* 2007;14(1):1–11.

Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013; 84: 415–421.

Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N. X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem.* 2009;109:1–14.

Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, Zelenova MA, Silvanovich AP, Yurov YB. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Mol Cytogenet.* 2012 Dec 31;5(1):46.

Ito Y, Goping IS, Berry F, Walter MA. Dysfunction of the stress-responsive FOXC1 transcription factor contributes to the earlier-onset glaucoma observed in Axenfeld-Rieger syndrome patients. *Cell Death and Disease* .2014;5, e1069;

Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet.* 2009 Feb;84(2):148-61. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.12.014. Epub 2009 Jan 22.

Jauhari P, Boggula R, Bhave A, Bhargava R, Singh C, et al. Aetiology of intellectual disability in paediatric out patients in Northern India. *Dev Med Child Neurol* 2011, 53(2):167-172. OpenURL N Engl J Med 2012, 367(20):1921-1929

Jelliffe-Pawlowski LL, Shaw GM, Nelson V, Harris JA. Risk of mental retardation among children born with birth defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003;157:545-50.

Jin P, Warren ST. New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Bioch Sci.* 2003;28(3): 152-8.

Johnston MV. Brain plasticity in paediatric neurology. *Eur J Paediatr Neurol.* 2003;7:105-13

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 2001; 294:1030-38.

Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2010;2:182–2

Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS., Passos-Bueno MR, et al. Wholegenome array-CGH screening in undiagnosed syndromic Patients. Old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet. Genome Res*. 2006; 115, 254–261.

Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, et al. X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. *Am. J. Hum. Genet*. 2004 74:552–557.

Leske MC. Open-angle glaucoma – an epidemiologic overview. *Ophthalmic Epidemiol* 2007; 14: 166–172.

Linhares ND, Svartman M, Valadares ER. Diagnóstico citogenético em pacientes com retardo mental idiopático. *Bra Patol Med Lab* v48 n 1 p. 33-39. Fevereiro 2012.

Lu X, Shaw CA., Patel A, Li J, Cooper ML, et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis. Summary of 2513 postnatal cases. *PLoS ONE* 2.2007; e327.

Marshall CR, Scherer SW. Detection and characterization of copy number variation in autism spectrum disorder. *Methods Mol Biol* 2012: 838: 115–135.2.

Medrano S, and Scrable H. Maintaining appearances– the role of p53 in adult neurogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005 331, 828–833.

Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP: Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med*. 2012, 366(8):733-743.

Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: A new series of 140 patients and review of published reports. *J. Med. Genet*. 2006 43, 625–633.

Mégarbané A, Le Lorc'h M, Elghezal H, et al. Pure partial 7p trisomy including the TWIST, HOXA, and GLI3 genes. *Journal of Medical Genetics*. 2001; vol. 38, no. 3, pp. 178–182.

Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann M, Murken 1. Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nature Genet*. 1993;5:376-80

Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, et al. Evidence report: genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the

American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2011;77(17):1629–1635

Miller DT, Adam MP, Aradhya S 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*.2010: 86: 749–764.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*.2010. 86, 749–764.

Miyake, N., Shimokawa, O., Harada, N., Sosonkina, N., Okubo, A., Kawara, H., Okamoto, N., Kurosawa, K., Kawame, H., Iwakoshi, M., et al. (2006). BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am.J. Med. Genet. A*. 140, 205–211.

Mulatinho MV, Llerena JC, Pimentel MM. FRAXA screening in Brazilian institutionalized individuals with nonspecific severe mental retardation. *Genet Test*.2000;4(3):283-7.

Newman W., Hamilton S, Ayres J, Sanghera N, Smith A, et al. Array comparative genomic hybridization for diagnosis of developmental delay: An exploratory cost-consequences analysis. *Clin.Genet*. 2007. 71, 254–259.

Nowakowska B, Stankiewicz P, Obersztyn E. Application of metaphase HR-CGH and targeted chromosomal microarray analyses to genomic characterization of 116 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2361–2369

Nunnari J, Fox TD, Walter P: A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 1993, 262:1997–2004.

Pashayan H, Pruzansky S, Putterman A. A family with blepharo-naso-facial malformations. *Am J Dis Child*.1973 Mar;125(3):389-93

Pickering DL, Eudy JD, Olney, AH, Dave BJ., Golden D, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet.Med*. 2010. 10, 262–266.

Ramakers GJA. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci*.2002;25(4):191-9.

Riggs E, Wain K, Riethmaier D, Smith-Packard B, Faucett W et al. Chromosomal microarray impacts clinical management. *Clin Genet* 2014, 85:147–153.

Ritney CD. Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74 Suppl I:30-36.

Ropers HH: Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010, 11:16



Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: Clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J. Med. Genet.* 2006. 43, 180–186. 1-187.

Ross CA, Pickart CM. The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 2004.14, 703–711.

Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 10: 4254–4261.

Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, et al. 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;11:139–146.

Santos-Rebouças CB, de Almeida LG, Belet S, Dos Santos SR, Ribeiro MG et al. Novel microduplications at Xp11.22 including HUWE1: clinical and molecular insights into these genomic rearrangements associated with intellectual disability. *J Hum Genet.* 2015 Apr;60(4):207-11. doi: 10.1038/jhg.2015.1. Epub 2015 Feb 5.

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005;42:699 –705.

Schwartzman JS. Síndrome de Rett. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003;25(2):110-13.  
van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annual review of genetics.* 2011;45:81–104.

Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J e 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.* 2007. *Semin. Med. Genet.* 145C, 335–345.

Shakib S, Desanti GE, Jenkinson WE, Parnell SM, Jenkinson EJ, et al. Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J Immunol.* 2009;182: 130–137.

Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat. Genet.* 2006. 38, 1038–1042.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and

duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J MedGenet.* 2004;41:241–248.

Shen Y, Irons M, Miller DT, Cheung SW, Lip V, Sheng X, et al. Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. *Clin. Chem.* 2007. 53, 2051–2059

Shevell M. Global developmental delay and mental retardation or intellectual disability: Conceptualization, evaluation, and etiology. *Pediatr.Clin. North Am.* 2008. 55,1071–1084.

Shieh JT, Aradhya S, Novelli A, Manning MA, Cherry AM, et al. Nablus mask-like facial syndrome is caused by a microdeletion of 8q detected by array-based comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet A.* 2006 Jun 15;140(12):1267-73.

Sims KB, Lebo R V, Benson G, Shalisk C, Schuback D, Chen Z-Y, et al. The Norrie disease gene maps to a 150 kb region on chromosome Xp11.3. *Hum Molec Genet* 1992;1 :83-9.

Slavotinek AM. Eye development genes and known syndromes *Mol Genet Metab.* 2011 104(4): 448-456.

Smith SE, Zhou YD, Zhang G, Jin Z, Stoppel DC, Anderson MP. Increased gene dosage of Ube3a results in autism traits and decreased glutamate synaptic transmission in mice. *Sci Transl Med.* 2011; 3:103ra197.

Srivastava AK and Schwartz CE. Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders: Causal Genes and Molecular Mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Oct; 46 Pt 2: 161–174.

Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR (2003) A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 4: 1128–1135. 10.1038/ni983 [doi];ni983

Tao VQ, Chan KY, Chu YW, Mok GT, Tan TY et al. The clinical impact of chromosomal microarray on paediatric care in Hong Kong. *PLoS One.* 2014 Oct 15;9(10):e109629.

Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome *Am J Med Genet.* 2000;97:195-203.

Tejada MI. Genetic mental retardation. Presentation of the GIRMOGEN network. *Rev Neurol.* 2006 Jan 7;42 Suppl 1:S1-6.

The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. *Cell.* 1994;78:23-33.

Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, et al. 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with

childhood apraxia of speech. *European Journal of Human Genetics* (2013) 21, 82–88

Thuresson AC, Bondeson ML, Edeby C, Ellis P, Langford C, et al. Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet. Genome Res.* 2007.118, 1–7.

Tyson C, Harvard C, Locker R, Friedman JM, Langlois S, Lewis E, et al. Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am. J. Med. Genet.* 2005. A. 139, 173–185.

Tumer Z, Bach-Holm D. Axenfeld-Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 1527–1539.

Uwineza A, Caberg JH, Hitayezu J, Hellin AC, Jamar M, et al. Array-CGH analysis in Rwandan patients presenting development delay/intellectual disability with multiple congenital anomalies. *BMC Med Genet.* 2014 Jul 12;15:79.

Vasconcelos MM. Retardo mental. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80(2 Supl):S71-S82

Van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annual review of genetics.* 2011; 45:81–104.

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 2003. 73,1261–1270.

Vissers LE, 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: 289–297.

Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, Van Bon BWM et al. Clinical significance of de novo and inherited copy number variation. Submitted.

Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, et al. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 2007.81, 768–779.

Willemsen R, Ostra BA. FMRP detection assay for the diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;97:183-8.

Wong A, Lese Martin C, Heretis K, Ruffalo T, Wilber K, et al. Detection and calibration of microdeletions and microduplications by array-based comparative genomic hybridization and its applicability to clinical genetic testing. *Genet. Med.* 2005. 7, 264–271.

Xiang B, Li A, Valentin D, Nowak NJ, Zhao H, Li P. Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic

hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008).146A, 1942–1954.

Yi JJ, Ehlers M D. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol.2007.Rev.* 59, 14–39.

Yoon SY, Lee Y, Kim JH, Chung AS, Joo JH, et al.Over-expression of human UREB1 in colorectal cancer: HECT domain of human UREB1 inhibits the activity of tumor suppressor p53 protein. *Biochem..Biophys. Res. Commun.*2005. 326, 7–17

Zoghbi HY. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science.* 2003;302(5646):826-30.

## Anexo I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESKARECIDO

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores. Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8 mL de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_, residente em \_\_\_\_\_ e domiciliado em \_\_\_\_\_, portador da Cédula de Identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_ nascido(a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade com a participação de meu (minha) filho(a) \_\_\_\_\_ no estudo

“Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico”, e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- ( ) Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- ( ) Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- ( ) Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Dra. Íris Ferrari

Pesquisadora responsável

Telefone para contato: (61) 3307 2505

**Anexo II**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

---

**ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA**

**Registro de Projeto:** CEP-FM 081/2009.

**Título:** "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

**Pesquisador Responsável:** Iris Ferrari.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

**Aprovação**

**Não aprovação.**

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 28/10/2009.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 25/11/2009.


---

**PARECER**

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UnB