



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

**Análise cromossômica por microarranjos em probandos com
indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações
cariotípicas**

Damiana Mírian da Cruz e Cunha

Goiânia-GO
©2015



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

Análise cromossômica por microarranjos em probandos com indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações cariotípicas

Damiana Mírian da Cruz e Cunha

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Goiânia-GO
©2015

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

C972a Cunha, Damiana Mírian da Cruz.
Análise cromossômica por microarranjos em probandos com indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações cariotípicas [manuscrito] / Damiana Mírian da Cruz e Cunha – Goiânia, 2015.

53 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética.

“Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz”.
Bibliografia.

1. Down, Síndrome de. 2. Genética. I. Título.

CDU 616.899.6(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 100/20145

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: DAMIANA MÍRIAN DA CRUZ E CUNHA

DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2015 E APROVADA COM CONCEITO...A...

O título foi alterado não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
(presidente-orientador)

Prof. Dra. Lysa Bernardes Minasi / PUC Goiás
(membro interno)

Prof. Dra. Thais Cidália Vieira Gigonzac / UEG
(membro externo)

Dedicatória

Ao meu pai João da Cruz e Cunha (*in memoriam*).

À minha mãe Maria Aparecida da Cunha.

Ao meu pai de coração Aparecido D. Da Cruz.

Aos meus irmãos Pedro Francisco da Cruz (*in memoriam*) e Marcelo Eduardo Candido

Pereira.

E aos meus sobrinhos Glênio Thomas da Cruz, Raphael Silva da Cruz e Alex Silva da Cruz.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Cláudio Carlos da Silva**, por sua amizade, apoio, incentivo, carinho e, também, por me orientar. E ao **Prof. Aparecido D. da Cruz (Peixoto)**, meu co-orientador, pelo seu incentivo, amizade e apoio.

Aos **pacientes e suas famílias** que doaram voluntariamente as amostras para que este estudo pudesse acontecer. À **Equipe Médica** que gentilmente encaminhou os pacientes até o laboratório. E a toda **Equipe** do Núcleo de Pesquisas Replicon pelo incentivo para que eu concluísse o mestrado e pela amizade que me dedicam.

À **Irene Plaza Pinto** por seu apoio na realização da CMA e pelo auxílio na análise e interpretação dos dados. Não menos importante, obrigado por sua amizade. E ao **Cristiano Luiz Ribeiro** pela generosa contribuição com o bandeamento G e análise das metáfases.

Ao meu pai de coração, **Aparecido D. da Cruz (Peixoto)**, por toda a sua dedicação e por ter me apoiado sempre. Por ser meu grande incentivador e pelo seu amor incondicional. À minha mãe **Maria Aparecida da Cunha**, que, mesmo sem estudo nenhum, sempre estimulou para que eu estudasse. Apesar das limitações atuais, impostas pela idade, ela ainda me apoia muito e acredita sempre no meu sucesso. Minha mãe, minha melhor amiga, obrigada! Aos meus irmãos **Pedro Francisco da Cruz (in memoriam)**, que de onde estiver sei que estará vibrando com esta minha conquista e **Marcelo Eduardo Candido Pereira** por sua ajuda cotidiana e em todos os sentidos e por seu amor incondicional.

Aos meus sobrinhos **Alex Silva da Cruz**, um dos meus maiores incentivadores e pelo seu auxílio para que eu pudesse concluir este estudo, **Raphael Silva da Cruz**, que com o seu amor incondicional me apoia sempre e em tudo e **Glênio Thomaz da Cruz**, ainda que distante, sempre torce por mim.

À minha comadre, prima e amiga **Karla Dias Nunes da Cunha** pelo seu apoio, incentivo, pelos bons momentos de alegrias, pelas confidências compartilhadas, por sua ajuda constante e por sua amizade, que será para sempre. À toda a **minha família** pelo apoio constante e a todos os meus **Amigos**, fontes da minha alegria e esperança e pelo incentivo para eu seguir adiante.

Aos **Professores** do Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelos seus conhecimentos. E à **Alessandra Malta** por sempre nos auxiliar nas dúvidas cotidianas de estudantes.

À **FAPEG** pela bolsa de estudos e ao **CNPq** pelo fomento à pesquisa que garantiram a conclusão do curso e a consecução deste estudo. À Secretaria Estadual de Saúde do Governo do Estado de Goiás e à Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo apoio e pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento do estudo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	iv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
Análise cromossômica por microarranjos em probandos com indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações cariotípicas.	
1. Resumo.....	11
2. <i>Abstract</i>	12
3. INTRODUÇÃO.....	13
4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	15
4.1. Avanços Metodológicos da Citogenética.....	15
4.2. A Síndrome de Down.....	18
5.OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo Geral.....	23
5.2. Objetivos Específicos.....	23
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
6.1. Seleção dos Participantes.....	24
6.2. Coleta e processamento das Amostras.....	25
6.3. Cariótipo com Bandas G.....	25
6.4. Hibridização Fluorescente in situ (FISH).....	26
6.5. Extração e Quantificação das Amostras.....	26
6.6. Análise Cromossômica por Microarranjos.....	26
6.6.1. Descrição do método de CMA.....	27
6.6.2. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs.....	27
6.6.3. Alterações, herança e classificação das CNVs.....	28
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
Paciente 1.....	32
Paciente 2.....	34
Paciente 3.....	36
Paciente 4.....	37
Paciente 5.....	38
Paciente 6.....	40
8. CONCLUSÃO.....	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
10. APENDICE.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns sinais fenotípicos associados à Síndrome de Down são comuns nos indivíduos afetados, podendo ser clinicamente reconhecidos com relativa facilidade (Fenótipo MIN #190685).

Figura 2. Fluxograma indicando o encaminhamento, triagem e seleção dos pacientes e as metodologias que foram usadas na tentativa de elucidação diagnóstica dos pacientes com indicação clínica de SD.

Figura 3. Interface do programa *Chromosome Analysis Suite*[®] 2.0 (Chas[®], Affymetrix – EUA), um software de análise dos dados citogenômicos contidos na matriz de genotipagem que permite a identificação de variações genética estruturais.

Figura 4. Paciente 1, encaminhado ao laboratório pelo Programa Estratégia Saúde da Família com indicação clínica de SD. A: Aspectos faciais, com ponte nasal larga e fenda palpebral oblíqua, dolicocefalia e micrognatia leves; B: Mão curta e larga; C: Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Figura 5. Hibridização fluorescente *in situ* de probando com sinais fenotípicos sugestivos de SD, sem alterações cariotípicas. A. Metáfase hibridizada com uma sonda para a região 10p14 do cromossomo 10 marcada em vermelho e uma sonda centromérica para 10p11.1-q11.1, marcada em verde. Setas assinalam os sinais fluorescentes, indicando o local da hibridização das sondas; B. Metáfase hibridizada com um sonda marcada em vermelho para o cromossomo 7, correspondendo a q11.23 para o diagnóstico da Síndrome de William-Beuren, e em verde para a região centromérica. Setas assinalam o local da hibridização das sondas

Figura 6. Paciente 2, encaminhado ao laboratório pela nutrologia com suspeita de trissomia 21. A: Aspectos faciais com ponte nasal larga; B: Implantação baixa da orelha; C: Mão esquerda em garra; D. Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Figura 7. Paciente 3, encaminhado ao laboratório pelo Programa Estratégia da Saúde da Família com suspeita de SD. A: Aspectos faciais com retrognatia; B: Implantação da orelha; C: mãos curtas e largas, com clinodactilia de D5. D. Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Figura 8. Paciente 4, encaminhada ao laboratório pela pediatria, com sinais sugestivos de SD. A: Aspectos faciais com discreta fenda palpebral oblíqua e ponte nasal larga; B: Palma da mão; C: Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Figura 9. Paciente 5, encaminhado ao laboratório pela pediatria com sinais sugestivos da SD. A: Aspectos faciais, incluindo ponte nasal larga, epicanto e fenda palpebral oblíqua; B: Pele frouxa na nuca; C: Mão curta e larga; D: Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Figura 10. Paciente 6, encaminhada ao laboratório pela pediatria, com indicação clínica de SD. Probando apresentado moderada dismorfia facial, incluindo ptose, fenda palpebral oblíqua, ponte nasal larga, micrognatia e proeminência frontal e dolicocefalia leve.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Total de casos encaminhados ao NPR/LaGene por médicos assistentes da rede pública de atenção à saúde de Goiás (Brasil) para o diagnóstico genético.

Tabela 2. Achados moleculares de 6 probandos, com sinais fenotípicos sugestivos de Síndrome de Down e cariótipos sem alterações estruturais ou numéricas, da análise cromossômica por microarranjos usando chip de DNA de alta densidade em uma coorte atendida pela rede pública de saúde de Goiás (Brasil).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Limite de detecção das alterações cromossômicas, segundo as metodologias disponíveis para a análise dos cromossomos.

Quadro 2. Características fenotípicas, que incluem dimorfismo facial e anormalidades estruturais reconhecidas no neonatos afetados pela Síndrome de Down observáveis ao exame físico do recém-nascido.

LISTA DE ABREVIACÕES

ADNPM: Atraso do Desenvolvimento NeuroPsicoMotor

APP: do inglês, *Amyloide Precursor Protein* – Proteína Precursora de Amilóide

BAC: do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome* – Cromossomo Artificial de Bactéria

CMA: do inglês, *Chromosomal Microarray* – Análise Cromossômica por Microarranjos

CNVg: do inglês, *Copy Number Variation, microduplication* – Variação do Número de Cópias, microduplicação

CNVp: do inglês, *Copy Number Variation, microdeletion* – Variação do Número de Cópias, microdeleção

CNVs: do inglês, *Copy Number Variation* – Variação do Número de Cópias

DA: Doença de Alzheimer

DAPI: do inglês, *4',6-DiAmidino-2-Phenylindole* – 4',6-DiAmidino-2-FenilIndole

DECIPHER do inglês *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources* – Banco de Dados de Imbalanços Cromossômicos e Fenótipos em Humanos usando Recursos Ensemble

DGV: do inglês *Database of Genomic Variants* – Banco de Dados de Variantes Genômicas

DI: Deficiência Intelectual

DSCR: do inglês, *Down Syndrome Critical Region* – Região Crítica da Síndrome de Down

DNA: do inglês *DeoxyriboNucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: do inglês, *EthylenDiamineTetraAcetic Acid* – Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético

FISH: do Inglês, *Fluorescence in situ Hybridization* – Hibridização Fluorescente *in situ*

GTG: Bandas G por tripsina e giemsa

ICDG-Ig, do inglês, *Congenital Disorder of Glycosylation Type Ig* – Doença Congênita de Glicosilação do Tipo Ig

LaGene/LACEN/SES-GO: Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros/Secretaria de Estado da Saúde de Goiás

MAPD: do inglês Median Absolute Pairwise Difference – Mediana Absoluta da Diferença Pareada)

MAPH: do inglês, *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization* – Hibridização de Sondas Amplificáveis por Multiplex

MLPA: do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação

NPR/PUC Goiás: Núcleo de Pesquisas Replicon/Pontifícia Universidade Católica de Goiás

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

SD: Síndrome de Down

SNP: do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo

SNP-QC: do inglês SNP – Quality Control – Controle de qualidade do SNP

SUS/MS: Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEA: Transtorno do Espectro Autista

1. RESUMO

Condições geneticamente determinadas acometem milhões de famílias no mundo. Mais de 40% dos casos de Deficiência Intelectual (DI) grave são causados por doenças monogênicas ou anomalias cromossômicas. Com relação à DI, no Brasil, com 185 milhões de habitantes, cerca de 25 milhões (14%) apresentam alguma deficiência. Desses, aproximadamente 17 milhões (68%) apresentam DI. A Síndrome de Down (SD) foi reconhecida e descrita pela primeira vez por John Langdon Down em 1866, sendo a mais frequente anomalia genética autossômica, contribuindo por aproximadamente 18% de todos os casos de DI. A incidência média é de 1 em cada 650 nascimentos, que aumenta com avanço da idade materna. Sua etiologia está relacionada ao excesso de material genético proveniente do cromossomo 21. Em geral, há ainda possibilidade de ocorrer trissomia 21 por translocação cromossômica e casos de mosaicismos pós-zigóticos. O fenótipo associado à SD seja variável em sinais e em intensidade. Porém, a DI é a característica altamente conservada entre os afetados e tem um grande impacto na saúde pública e na qualidade de vida individual. Apesar das características fenotípicas da SD ser patognomônicas, ainda persiste na comunidade médica o desafio do diagnóstico clínico. O presente estudo relatou a experiência da avaliação de 6 probandos com fenótipos complexos, que apresentavam características em comum com a SD. No entanto, embora o exame físico tenha gerado a hipótese clínica, os testes laboratoriais de citogenéticas não foram úteis para a resolução diagnóstica. Neste contexto, foi aplicada a Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA) para a elucidação diagnóstica dos casos com indicação clínica para SD cujos cariótipos apresentaram-se sem alterações cromossômicas numéricas ou estruturais aparentes. Para cerca de 83,3% (5/6) dos casos apresentados no presente estudo, ainda se faz necessário o uso de metodologias de maior resolução como o sequenciamento de exomas ou o sequenciamento e nova geração para tentar elucidar a alteração genômica subjacente aos achados fenotípicos dos pacientes, que devem ser, subsequentemente, confirmados com estudos funcionais e epidemiológicos para estes fenótipos variantes raros. Conforme discutido por Howell e colaboradores (2013), apesar dos grandes avanços no diagnóstico usando estratégias de neuroimagem, moleculares e metabólicas, uma proporção significativa de crianças com atraso global do desenvolvimento, com ou sem sinais dismórficos, permanecerão sem um diagnóstico conclusivo da causa subjacente ao fenótipo clinicamente reconhecido. No presente estudo, mesmo não apresentando alterações sugestivas para SD, os casos analisados apresentaram diversas alterações identificadas pelo CMA que em conjunto possuem potencial para explicar os fenótipos dos probandos e orientar as tomadas de decisões por parte famílias e dos profissionais de saúde que as assistem. Os resultados apresentados e discutidos nesta dissertação permitiram concluir que a taxa de detecção de alterações genômicas para o diagnóstico dos casos apresentados foi de ~17%. No entanto, nenhum paciente apresentou a SD, conforme sugerido pela indicação clínica, pois em nenhum caso houve o envolvimento da região crítica da Síndrome de Down no cromossomo 21. A taxa de diagnóstico laboratorial para a SD foi de 78,5%, em consonância com o esperado para as tendências de diagnóstico desta síndrome no mundo. A CMA permitiu estabelecer a correlação genótipo-fenótipo para um caso, para o qual foi observado deleção proximal do gene *SHANK3*, cuja haploinsuficiência é responsável pela Síndrome de Phelan-McDermid. No presente estudo foram identificados 4 genes que poderiam estar contribuindo com os fenótipos dos probandos, a saber: *AGLI2*, *MAGEA8*, *ILIRAPL1* e *CNTNAP2*, localizados em 22p13, Xq28, Xp21 e 7q35, respectivamente. Este conjunto de genes merecem destaque em estudos detalhados de genômica estrutural e funcional para apontar genes candidatos correlacionados aos fenótipos raros.

Palavras-chave: DSCR, microdeleção, microduplicação, alterações genômicas.

2. ABSTRACT

Genetically determined conditions affect millions of families worldwide. More than 40% of cases of severe Intellectual Disability (ID) are caused by monogenic diseases or chromosomal abnormalities. In Brazil, a country with 185 million people, some disability is expected to affect about 25 million (14%) people, and of these, approximately 17 million (68%) would have ID. Down's Syndrome (DS) was recognized and first described by John Langdon Down in 1866. DS is the most common autosomal genetic abnormality, contributing with approximately 18% of all cases of DI. The average prevalence rate is 1:650 live births, which increases with advancing maternal age. DS aetiology is related to the excess of genetic material from an extra chromosome 21. DS could also results from chromosomal translocation resulting in trisomy 21 and post-zygotic mosaicism. The phenotype associated with DS varies in signs and intensity. However, ID is a highly conserved feature on those who are affected by the trisomy 21 and has a major impact on public health and individual quality of life. Despite the phenotypic pathognomonic characteristics of DS, there is still a challenge in the clinical diagnosis. The current study reported the laboratory investigation of 6 probands with complex phenotypes, which had features in common with the SD. However, while the physical examination generated the clinical hypothesis, the cytogenetic laboratory tests were not useful for diagnostic resolution. In this context, Chromosomal Microarray Analysis (CMA) was used to support the laboratory diagnosis of cases with clinical indication of SD whose karyotypes showed up without apparent numerical or structural chromosome changes. In our study, laboratory diagnosis using CMA was not possible for 83.3% (5/6) of the cases. For those, higher-resolution methods such as exon sequencing or new generation sequencing must be used to assist elucidating the underlying genomic alteration behind the observed the rare variant phenotypes. As discussed by Howell et al (2013), despite major advances in diagnosis using neuroimaging, molecular, and metabolic strategies a significant proportion of children with global developmental delay, with or without dysmorphic signs will remain without a conclusive diagnosis of the underlying cause clinically recognized phenotype. In our study, although there were no genomic changes suggestive of DS, the analyzed cases showed a gain and losses of genomic material identified by the CMA that have potential to explain the phenotype of probands and guide decision-making on the part of families and the health care providers. The results presented and discussed in this dissertation showed a detection rate of ~17%. However, no patient had DS, as suggested by the clinical hypothesis, as there was no involvement of the critical region of Down Syndrome on chromosome 21 in any case. The laboratory diagnosis rate for the DS was 78.5% in line with expectations and trends in the diagnosis of this syndrome worldwide. The CMA allowed establishing the genotype-phenotype correlation for one case, for which it was observed a proximal deletion of SHANK3 gene whose haploinsufficiency is responsible for Phelan-McDermid Syndrome. In this study we identified four genes that could be contribute to the phenotypes of probands, namely: AGL12, MAGEA8, IL1RAPL1, and CNTNAP2, located in 22p13, Xq28, Xp21 and 7q35, respectively. This set of genes should be highlighted in structural and functional genomic studies to pinpoint candidate genes correlated to rare phenotypes.

Key words: *DSCR, microdeletion, microduplication, genomic changes*

3. INTRODUÇÃO

A última década experimentou grandes avanços na área do diagnóstico molecular das doenças genéticas. No entanto, ainda se observa um descompasso entre a possibilidade diagnóstica e sua disponibilidade para o cidadão, via Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde (SUS/MS). Neste contexto, delinea-se um desafio para a genética no Brasil, evidenciado pelo esforço nacional dos pesquisadores, para que o Ministério da Saúde viabilize a política de atenção integral à saúde genética do cidadão, contemplando o atendimento pelo SUS das consultas genéticas, aconselhamento genético e exames laboratoriais para o diagnóstico (STORNILO, et al., 2011).

Condições geneticamente determinadas acometem milhões de famílias no mundo. Em ~5% das gestações, nasce uma criança com algum tipo de anomalia congênita, deficiência ou doença genética que comprometerá seu desenvolvimento e qualidade de vida (CONASS 2007). Nos países desenvolvidos, as afecções de etiologia total ou parcialmente hereditária respondem por 36% a 53% das admissões em hospitais pediátricos (DEY, 2013). Nas nações em desenvolvimento, condições semelhantes estão entre 15-25% das causas de mortalidade perinatal e infantil. Na maioria dos países em desenvolvimento, onde vivem mais de 80% da população mundial e onde a maior parte das crianças nascerá, são muitos os obstáculos ao progresso e à aplicação da tecnologia genética na prática médica (ZLOT, 2008). Outros desafios, entre os quais pobreza e mortalidade infantil elevada que são consideradas mais urgentes que as doenças genéticas e os defeitos congênitos, que não são registradas adequadamente ou sequer diagnosticadas e acabam não sendo tratadas ou assistidas como prioridades tampouco passam a integrar as agendas nacionais, estaduais e municipais de atenção à saúde.

Mais de 40% dos casos de Deficiência Intelectual (DI) grave são causados por doenças monogênicas ou anomalias cromossômicas. Com relação à DI, no Brasil, com 185 milhões de habitantes, cerca de 25 milhões (14%) apresentam alguma deficiência. Desses, aproximadamente 17 milhões (68%) apresentam deficiência intelectual (MOREIRA et al., 2000). Países que dispõem de registros epidemiológicos populacionais das condições genéticas geram informações confiáveis, que indicam uma tendência ao aumento da prevalência dessas condições. Nos países desenvolvidos, este aumento possivelmente reflete a falta de medidas preventivas e terapêuticas adequadas (MOREIRA et al., 2000). O Brasil não dispõe de dados epidemiológicos confiáveis em relação à distribuição das doenças genéticas, anomalias congênitas e deficiência intelectual na sua população. De um modo geral, é óbvia a

melhora dos indicadores nacionais de saúde nas últimas décadas. Daí então, as anomalias congênitas têm se destacado, passando de 6% a 12% como causa de mortalidade infantil, no período de 1980 a 1997, segundo dados do DATASUS (BRASIL, 2012). A deficiência intelectual corresponde a uma das categorias mais amplas de distúrbios, acometendo de 1% a 3% da população nos países industrializados, enquanto nos países em desenvolvimento estima-se uma prevalência cerca de 3x maior. Em todo mundo, a Síndrome de Down é reconhecida como a causa genética mais comum da DI (DEY, 2013; MILLER et al., 2010).

A SD foi reconhecida e descrita pela primeira vez por John Langdon Down em 1866, sendo a mais frequente anomalia genética autossômica, contribuindo por aproximadamente 18% de todos os casos de DI. A incidência média é de 1 em cada 650 nascimentos, que aumenta com avanço da idade materna. Sua etiologia está relacionada ao excesso de material genético proveniente do cromossomo 21. Em geral, o evento mais comum para a trissomia livre do cromossomo 21 é a trissomia constitutiva pré-zigótica resultante da não disjunção cromossômica do 21. Há ainda possibilidade de ocorrer trissomia do 21 por translocação cromossômica e casos de mosaicismos pós-zigóticos. O fenótipo associado a SD é variável em sinais e em intensidade. Porém, a DI é a característica altamente prevalente entre os portadores da trissomia do 21 e tem um grande impacto na saúde pública e na qualidade de vida individual e familiar (DEY, 2013). O conhecimento da patogênese da SD ainda requer intensa investigação e muitos anos de pesquisa ainda serão necessários para se compreender e elucidar completamente os mecanismos moleculares subjacentes a manifestação do fenótipo. No entanto, clinicamente ainda é comum a observação de um fenótipo com os traços comumente observados nos probandos com SD, mas que o diagnóstico laboratorial dos pacientes resulta em achados cariotípicos sem alterações numéricas ou estruturais aparentes.

O cariótipo por bandeamento GTG é um método barato e relativamente fácil de ser desenvolvido na rotina laboratorial. Ainda é a metodologia mais comumente usada para o diagnóstico citogenético dos pacientes com SD. Recentemente, várias técnicas moleculares têm permitido avanços consideráveis no campo da citogenética clínica, propiciando a determinação de pequenas perdas e ganhos de material genético com elevada resolução e acurácia. Dentre as novas metodologias, a Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA, do inglês, *Chromosomal Microarray*) fornece um alto poder de investigação de variações genéticas estruturais.

O objetivo geral do presente estudo foi aplicar a CMA para a elucidação diagnóstica dos casos com indicação clínica para SD, cujos cariótipos apresentaram-se sem alterações numéricas ou estruturais aparentes do cromossomos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Avanços Metodológicos da Citogenética

É consenso internacionalmente reconhecido que o início da citogenética humana é associado aos estudos conduzidos por Walther Flemming, um pesquisador de anatomia austríaco, a partir da publicação de suas primeiras ilustrações dos cromossomos humanos em 1882. Foi ele também quem definiu o conceito de cromatina, sendo ela a parte corada do núcleo. Ao estudar estrutura e processos do núcleo de forma sistemática, Flemming alçou pela primeira vez o termo mitose para referir-se ao processo de divisão celular. Os resultados de Flemming contribuíram para que, em 1888, Heinrich Waldeyer denominasse de cromossomos (do Grego, corpos coloridos) as estruturas visíveis no núcleo em divisão. Estas observações, aliadas à redescoberta das proposições mendelianas em 1900, foram sugeridas as relações entre os determinantes da hereditariedade e os cromossomos. Em consequência, em 1902, Theodor Boveri e Walter Sutton propuseram a Teoria Cromossômica. E foi W. Sutton quem alçou o termo de citogenética para o estudo dos cromossomos (JACOBS, 2014; DEY, 2013; MALUF et al., 2011; 43. PAWELETZ, 2001).

No Final do século XIX e início do século XX, com a melhora na resoluções das lentes ópticas, a citogenética recebe um impulso tecnológico que permitiu a identificação e a estimativa do número correto dos cromossomos humanos, incluindo a observação do dimorfismo próprio dos cromossomos sexuais. O cariótipo humano foi então definido por Joe H. Tjio e A. Levan como diploide ($2n=46$), com uma notação cariotípica de 46,XY e 46,XX para os sexos masculino e feminino, respectivamente. O cariótipo foi definido como sendo gradativo, contendo cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos e um sistema simples do tipo X/Y para a determinação sexual (MALUF et al., 2011; HARPER, 2006).

Na década de 50, foram propostos os métodos de cultivo de células como sendo mais eficientes que os cortes histológicos para o estudo dos cromossomos. Subsequentemente, foram propostas as adaptações técnicas para melhorar o espalhamento do cromossomos a partir do tratamento das células com uma solução hipotônica de cloreto de potássio e o pré-tratamento das células obtidas da cultura com colchicina, que atua como bloqueador do fuso mitótico, para aumentar a quantidade de células em metáfase (MALUF et al., 2011). Com o aprimoramento das técnicas de estudos dos cromossomos, foram propostas as metodologias de bandeamento cromossômico. Dentre elas, se destaca o bandeamento GTG, que usa tripsina e Giemsa para revelar bandas escuras e claras nos cromossomos humanos, denominadas de

bandas G. O bandeamento GTG possibilitou estudar as alterações estruturais envolvendo os cromossomos de uma metáfase e, conseqüentemente, aumentou a resolutividade dos diagnósticos citogenético das condições humanas (JACOBS, 2014; DEY, 2013)

Em 1959, diversos laboratórios já estavam envolvidos com o estudo dos cromossomos humanos e uma variedade de sistemas de classificação e nomenclatura haviam sido propostos. Isto provocava dificuldade de comunicação e tornava confuso os achados laboratoriais. Para minimizar esta confusão, foi feita uma conferência em Denver, no Colorado-EUA, que propôs um sistema de nomenclatura para os cromossomos, que seria usado internacionalmente. Este sistema ainda é atualizado periodicamente e continua em vigor até os dias atuais, sendo conhecido como Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética Humana (do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (SHAFFER & TOMMERUP, 2005). De acordo com o consenso de citogenética internacional, os cromossomos humanos foram classificados em 23 pares, sendo 22 pares de autossomos e um par de cromossomo sexual. Os pares autossômicos foram numerados de 1 a 22 em ordem do maior para o menor de acordo com o seu tamanho e os cromossomos sexuais foram separados em X e Y. Em função do consenso sobre a posição dos centrômeros, os cromossomos foram separados em grupos, nomeados de A a G, sendo A e F cromossomos metacêntricos, B, C e E cromossomos submetacêntricos, D e G, cromossomos acrocêntricos. O X foi agrupado como um cromossomo do grupo C e o Y como um cromossomo do grupo G (SHAFFER & TOMMERUP, 2005).

Todas as descobertas acerca dos cromossomos possibilitaram um avanço significativo na áreas das ciências biológicas. Os dados relativos aos cariótipos passaram a ser usados para inferências evolutivas e taxonômicas entre as espécies, nos estudos da diversidade genética e de filogenia. Adicionalmente, as informações obtidas com os estudos dos cromossomos foi muito útil na medicina e em suas diferentes especialidades, que puderam contar com uma ferramenta eficaz para o diagnóstico de algumas síndromes genéticas e de malformações congênitas, que surgem como distúrbios pré- ou pós-natais (CHAVES & NICOLAU, 2013). Dentre as várias síndromes genéticas que podem ser diagnosticadas com o estudo dos cromossomos, encontra-se a SD, caracterizada em geral pela trissomia do cromossomo 21, uma alteração descoberta em 1959 (NERI & OPITZ, 2009).

A linha do tempo do histórico da citogenética se destaca em dois períodos. O primeiro, reconhecido como citogenética clássica, caracterizado pelo estudo dos cromossomos com e sem bandeamentos. O segundo período consiste da citogenética molecular, caracterizado pelo uso de ferramentas moleculares para estudar os cromossomos. Nesta fase, foram incorporadas

técnicas da biologia molecular, que aumentou a resolução das análises cromossômicas, a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Neste cenário renovado da citogenética destacaram-se técnicas inovadoras como: a Hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do Inglês, *Fluorescent in situ Hybridization*), a Análise Cromossômica por Microarranjos (do inglês, *Chromosomal Microarray – CMA*), a Amplificação Multiplex e Hibridização de Sondas (MAPH, do inglês, *Multiplex Amplification and Probe Hybridization*) e a Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação (MLPA, do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (MALUF et al., 2011; KOUTSOS et al., 2009).

As metodologias da citogenética molecular aumentaram a resolutividade dos diagnósticos, pois alterações que afetavam a sequência do cromossomo na ordem de ≤ 5 Mb passaram a ser observadas e sua relevância clínica puderam ser caracterizadas. Neste cenário, estudos recentes tem demonstrado o papel dos rearranjos cromossômicos subteloméricos e submicroscópicos para a elucidação dos agravos genéticos (JACOBS, 2014; CHAVES & NICOLAU, 2013; GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006). O Quadro 1 contém a aplicabilidade e o a resolução dos diferentes testes citogenéticos rotineiramente empregados no diagnóstico das doenças genéticas humanas.

Quadro 1. Limite de detecção das alterações cromossômicas, segundo as metodologias disponíveis para a análise dos cromossomos.

Método	Resolução	Aplicação	Referência
Cariótipo com bandas GTG, padrão de 500 bandas	5 -10 Mb	Pequenas deleções e anomalias estruturais	SCHRÖCK et al., 1997
Cariótipo com bandas GTG, padrão de 800 bandas	4-6 Mb	Análise de cromossomos em prófase, prometáfase ou estágios precoces da placa metafásica	JACKSON, 2002
FISH metafásico	2 a 3 Mb	Análise de pontos de quebras específicos nos cromossomos, úteis na determinação das síndromes de microdeleções	WIEGANT et al., 2002
FISH interfásico	≤ 50 kb	Detecção de rearranjos cromossômicos	WIEGANT et al., 2002
CGH cromossômico	3–10 Mb	Desequilíbrios no número de cópias do DNA ou instabilidades genômicas	KALLIONIEMI et al., 1992
CGH array	50–150kb (BAC) e 25–85pb (oligos)	Detecção de microarranjos cromossômicos	BALDWIN, et al., 2008
CMA	≥ 100 kb	Deleções e duplicações associados às doenças genômicas	MANNING & HUDGINS, 2010

A técnica de FISH consiste no uso de sequências de DNA marcadas com um fluorocromo, conhecidas como sondas. As sondas são usadas para anelar especificamente ao alvo com base na complementaridade entre as sequências entre eles. Em geral, os alvos são regiões conhecidas especificamente localizadas em uma região do cromossomo. A FISH aumentou a especificidade do diagnóstico citogenético (BRAMMER et al., 2007).

A CMA corresponde a um método recente da citogenética molecular, que aumenta a resolução e detecta pequenas variações no número de cópias de algumas sequências cromossômicas, denominadas CNVs (do inglês, *Copy Number Variants*). Para a avaliação dos cromossomos humanos, a CMA usa o recurso de sondas desenhadas para marcar as regiões clinicamente relevantes do genoma. As sondas são constituídas de oligonucleotídeos contendo um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP, do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism*). Para a detecção de uma CNV, a sequência do DNA do paciente é comparada com a mesma sequência do genoma de referência. Os dados da CMA podem ser bastante informativos, permitindo alcançar o diagnóstico dos casos nos quais a condição genética seja causada por ganhos ou perdas de sequências cromossômicas (MILLER et al., 2010; MATSON & SHOEMAKER, 2009; PROBS et al., 2007).

4.2. A Síndrome de Down

As variações cromossômicas podem ocorrer de forma espontânea ou induzida. Pode ser uma condição normal do desenvolvimento ou ser a causa subjacente a um processo patológico. Pode ocorrer em diferentes células de um mesmo tecido ou em tecidos diferentes. Ou podem ser constitutivas, afetando todos os tecidos de um organismo (LUTHARDT & KEITGES, 2001). As variações cromossômicas resultantes de mutações podem ser deletérias ao organismo e causar a variação cariotípica geralmente relatada como a causa subjacente a uma condição genética de origem cromossômica. Nos seres humanos as variações cromossômicas compatíveis com a viabilidade do organismo são as aneuploidias e algumas variações estruturais decorrentes de rearranjo cromossômico. Entre as aneuploidias, as monossomias e as trissomias são melhores toleradas durante o desenvolvimento. As aneuploidias dos cromossomos sexuais são mais frequentes do que as aneuploidias envolvendo os autossomos. Dentre as aneuploidias humanas, a mais prevalente é a trissomia do cromossomo 21, que é a causa da SD (DEY, 2013).

A SD foi clinicamente descrita por John Langdon Down em 1866. Down relatou uma combinação de sinais fenotípicos característicos, que incluía deficiência intelectual e facie mongólica para um grupo de pacientes acompanhados por eles com um quadro clínico

denominado de idiotia (DOWN, 1866). Posteriormente, com o advento dos métodos de cariotipagem, a trissomia do cromossomo 21 foi primeiramente relatada por Lejeune e colaboradores em 1959, em associação com o fenótipo mongol descrito previamente por Down (DEY, 2013).

A SD constitui uma das causas mais frequentes da deficiência intelectual (DI), sendo estimado que cerca de 18% da população com DI são portadores da trissomia do 21. Estudos atuais têm ressaltado que as habilidades intelectuais dos portadores da SD vêm sendo subestimadas ao longo dos anos. Atualmente, a DI na SD é classificada como leve a moderada. Uma melhor capacidade cognitiva é observada entre os casos de mosaïcismo, cujos quocientes de inteligência atingem valores limítrofes de normalidade (MOREIRA et al., 2000). As características fenotípicas são altamente conservadas entre os indivíduos afetados com a SD, sendo mais prevalentes o epicanto, as malformações cardíacas, em especial defeitos do septo atrioventricular, e as alterações gastrointestinais. Os achados fenotípicos na SD (Figura 1) são afetados pelas etnias das populações observadas e, portanto, podem variar entre os diferentes grupos populacionais (DEY, 2013; FREEMAN et al., 2008).



Acervo: NPR/LaGene

Figura 1. Alguns sinais fenotípicos associados à Síndrome de Down são comuns nos indivíduos afetados, podendo ser clinicamente reconhecidos com relativa facilidade (Fenótipo MIN #190685).

O Quadro 2, a seguir, relaciona a frequência dos sinais fenotípicos geralmente observados ao exame físico nas crianças nascidas com a SD.

Quadro 2. Características fenotípicas, que incluem dimorfismo facial e anormalidades estruturais, reconhecidas no neonatos afetados pela Síndrome de Down são observáveis ao exame físico do recém-nascido.

Sinais	Frequência (%)	Referência
Gerais		
Hiperflexibilidade	15,0	FIGUEIREDO et al., 2012
Hipotonia muscular	99,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Malformações cardíacas	45,0	FREEMAN et al., 2008
Alterações gastrointestinais	12,8	FIGUEIREDO et al., 2012
Cabeça		
Braquicefalia	20,5	FIGUEIREDO et al., 2012
Fenda palpebral oblíqua	90,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Epicanto	40,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Manchas de Brushfield (íris)	12,5	FIGUEIREDO et al., 2012
Implantação baixa das orelhas	50,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Perda auditiva	90,0	FREEMAN et al., 2008
Ponte nasal achatada	80,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Boca		
Língua protusa	15,0	PAVARINO-BERTELLI et al., 2005
Palato alto	10,3	FIGUEIREDO et al., 2012
Pescoço		
Pele frouxa na nuca	82,0	MOREIRA & GUSMÃO, 2002
Mão		
Prega palmar única	59,0	MOREIRA & GUSMÃO, 2002
D5 curto e clinodáctilo	18,1	MOREIRA & GUSMÃO, 2002

Os indivíduos portadores da trissomia do 21 apresentam incidência elevada de leucemias agudas, tanto da linhagem linfóide quanto mieloide. Foi estimado um incremento de 10 a 20 vezes no risco relativo para a população de SD desenvolver leucemias, em particular a leucemia megacariocítica, cuja frequência é cerca de 200 a 400 vezes maior entre os afetados (ZIPURSKY et al., 1987). Adicionalmente, os portadores da SD apresentam risco relativo aumentado para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA) de início precoce. Cerca de 70% dos pacientes com SD apresentarão demência aos 60 anos. O fator de risco para a DA associada a SD já foi elucidado e é relacionado com a triplicação do gene *APP*, que está contido no cromossomo 21. O gene *APP* (do inglês, *Amyloide Precursor Protein*) codifica para um receptor de superfície celular e uma proteína precursora transmembrana, reconhecidamente implicada na DA. Avanços recentes no tratamento e estratégias diferenciadas de inclusão social aumentaram a qualidade de vida dos pacientes com SD e, conseqüentemente, promoveram o aumento da expectativa de vida das pessoas com a síndrome. Atualmente, nos países desenvolvidos a expectativa média de vida para os portadores da trissomia do 21 é ≥ 55 anos (WISEMAN et al., 2009).

Nos países desenvolvidos, cerca de 0,45% das concepções em humanos são trissômicas para o cromossomo 21. No entanto, a incidência da trissomia 21 pode variar entre as populações e é influenciada pela idade materna. No mundo, a incidência da trissomia varia de 1:319 a 1:1000 nascidos vivos, com uma incidência média de 1:650 (WISEMAN et al., 2009). Segundo o Manual de Atenção à Saúde da Pessoa com Síndrome de Down no âmbito do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde(SUS/MS), no Brasil, a incidência da SD em nascidos vivos varia de 1:600 a 1:800 nascimentos, com uma média de 8.000 novos casos anuais (BRASIL, 2013). De acordo com os dados levantados pelo IBGE, com base no censo de 2000, existem 300 mil pessoas com SD no Brasil, com expectativa média de vida de 50 anos (BRASIL, 2012). Os dados nacionais são semelhantes às estatísticas mundiais (DEY, 2013).

Em relação aos aspectos citogenéticos subjacentes à trissomia do cromossomo 21 ressalta-se que em cerca de 95% dos casos trata-se de um achado constitutivo, que se origina da trissomia com três cópias livres do 21. Em geral, a trissomia do 21 é resultante da não disjunção dos cromossomos na meiose, sendo, portanto, um evento pré-zigótico. Em cerca de 5% dos casos, a trissomia é resultante da translocação entre o cromossomo 21 e, mais frequentemente, o cromossomo 14 ou da formação de isocromossomos envolvendo o cromossomo 21. Do total de casos de SD, entre 2 a 4% dos probandos apresentam uma trissomia do 21 de origem pós-zigótica, reconhecida pelo mosaicismos de células de linhagens trissômica e normal (BRAVO et al., 2012). Quando o erro da não disjunção ocorrer durante a meiose I, o indivíduo recebe uma cópia de cada cromossomo parental. Este fenômeno é conhecido como heterozigozidade dissômica. Quando ocorrer na meiose II, o probando recebe duas cópias iguais do mesmo cromossomo parental que é conhecido como homozigoto dissômico ou reduzido. Atualmente, marcadores STRs distribuídos no cromossomo 21 permitem a identificação da origem parental do cromossomo extra (DEY, 2013; BRAVO et al., 2012).

A SD é uma das condições genéticas mais frequente que resulta em características físicas e mentais específicas, sendo a doença genética mais comum associada à deficiência intelectual. Os indivíduos afetados pela trissomia 21 apresentam atraso no desenvolvimento das habilidades e déficits motores no início da infância e déficits cognitivo na idade escolar. Apesar de algumas limitações impostas às pessoas com SD, a inclusão social, aliadas as terapias recuperadoras e/ou reabilitadoras dos afetados, poderão minimizar as dificuldades nos aspecto social e comportamental. O estímulo adequado e precoce das crianças afetadas ampliam as possibilidade de aprimoramento de suas potencialidades (RIBEIRO et al., 2011).

Adicionalmente, a orientação e os esclarecimentos prestados por equipes multiprofissionais contribuem para que os pais das crianças com SD fiquem ativamente envolvidos e seguros em relação ao comportamento e ao desenvolvimento dos seus filhos. Isto facilita o planejamento de métodos instrutivos e criativos, visando a um processo de aprendizagem mais eficiente. Aprendizagem, desenvolvimento e adequação social são possíveis para as pessoas com SD, mas o suporte familiar é fundamental e proporciona um grande benefício no pleno desenvolvimento individual dos afetados (DEY, 2013; RIBEIRO et al., 2011; FELIUBADALÓ et al., 2006).

Apesar de haver uma extensa variação do fenótipo associado à SD, uma combinação de dismorfologia facial e atraso no desenvolvimento permitem o diagnóstico clínico para a maioria dos afetados. O nascimento de uma criança afetada pela SD merece atenção por parte da equipe multidisciplinar e é recomendado o aconselhamento genético à família. As estimativas exatas para o risco de recorrência depende do cariótipo do probando. A trissomia livre do 21 e os casos de mosaicismo geralmente tem risco de recorrência de 1%, que pode ser discretamente aumentado em função da idade materna. Para mulheres com idade ≤ 35 anos o risco revisado para uma nova gestação com SD aumenta cerca de 3,5 vezes. Para mulheres com idade ≥ 35 anos, para uma nova gestação com SD, o risco relativo à idade sofre um incremento de 1,7 vezes. Por outro lado, a SD causada por translocações tem um risco maior de recorrência. Se os progenitores não forem portadores da translocação balanceada, o risco de recorrência é de 2 a 3%. No entanto, se um dos progenitores é portador da translocação balanceada, envolvendo o cromossomo 21 e outro cromossomo acrocêntrico, mais comumente o 14, o risco de recorrência é dependente do tipo da translocação, dos cromossomos envolvidos e do sexo do progenitor afetado. Cerca de 25% dos casos de SD por translocação Robertsoniana são herdados. Neste cenário, o risco de recorrência quando a mãe é portadora da translocação balanceada é de 12% e quando o pai é o portador, o risco de recorrência é de 3%. Para cerca de 75% de crianças com SD, devido a translocação Robertsoniana, os progenitores têm cariótipos normais e o risco de recorrência é de 2 a 3%. No entanto, quando a translocação Robertsoniana envolve dois cromossomos 21, o risco de recorrência é de 100%, independente do progenitor afetado pela translocação balanceada. Embora o risco teórico de uma pessoa com SD ter uma criança afetada é de 50% e de 66%, quando se considera os dois progenitores afetados, estimar o risco empírico da ocorrência do nascimento e uma criança com SD é muito difícil, uma vez que a taxa de reprodução é muito baixa neste cenário (DEY, 2013).

5.OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Aplicação da CMA para a elucidação diagnóstica dos casos com indicação clínica para SD, cujos cariótipos apresentaram-se sem alterações numéricas ou estruturais aparentes do cromossomos.

5.2. Objetivos específicos

1. Estabelecer o diagnóstico laboratorial da Síndrome de Down em pacientes atendidos pela rede pública de saúde do Estado de Goiás;
2. Avaliar por CMA o genótipo de pacientes encaminhados com suspeita clínica de SD e que apresentaram cariótipo sem alteração visíveis ao microscópio para se estabelecer a possível correlação genótipo-fenótipo;
3. Estabelecer a origem das CNVs;
4. Classificar os achados genômicos em conformidade com o consenso internacional;
5. Identificar os genes que poderiam atuar como candidatos para explicar a variação fenotípica dos pacientes.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC Goiás) e no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (LaGeen/LACEN/SES-GO). Foram analisados no período de 1 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2014, 79 casos de pacientes com indicação clínica de SD. A Figura 2 ilustra resumidamente o delineamento do presente estudo.

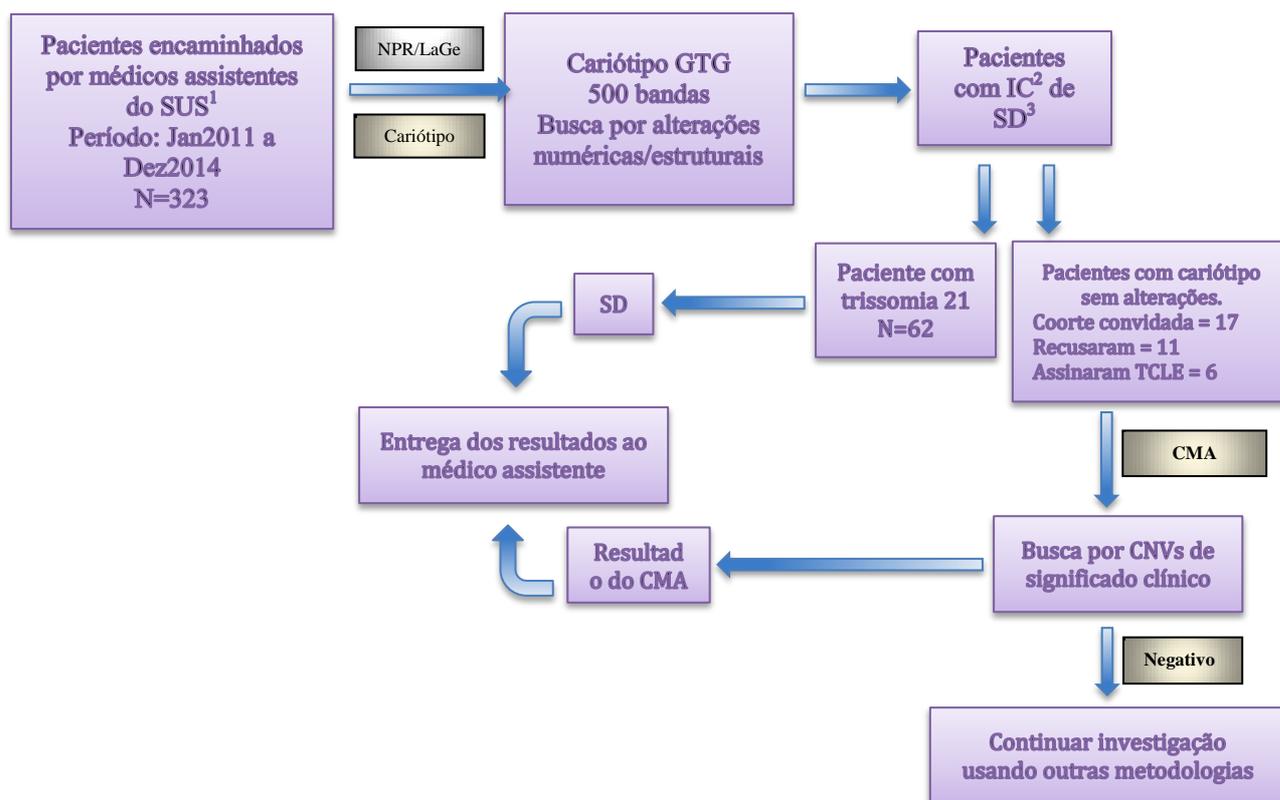


Figura 2. Fluxograma indicando o encaminhamento, triagem e seleção dos pacientes e as metodologias que foram usadas na tentativa de elucidação diagnóstica dos pacientes com indicação clínica de SD. Legenda: ¹Sistema Único de Saúde, ²Indicação Clínica e ³Síndrome de Down.

6.1. Seleção dos Participantes

Foram selecionados pacientes com indicação clínica de Síndrome de Down, encaminhados por médicos assistentes das redes municipal e estadual de saúde, e seus progenitores. Após esclarecimentos sobre o projeto, os pacientes e seus pais foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme cópia em anexo (Apêndice 1). O presente estudo atendeu ao disposto na Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-Goiás, com o CAAE

0051.0.168.000-11. Foram considerados como participantes, os voluntários que atenderam aos seguintes critérios de inclusão abaixo relatados:

Critérios de Inclusão dos pacientes do estudo;

- Pacientes com indicação clínica de Síndrome de Down, com pais biológicos vivos;
- Progenitores concordaram em doar voluntariamente material biológico para o estudo.

6.2. Coleta e processamento das Amostras

Após a assinatura do TCLE, foram obtidas as amostras biológicas dos pacientes, correspondendo a 5mL de sangue periférico heparinizado para realização do cariótipo e 5mL sangue periférico com EDTA para extração de DNA. O sangue foi acondicionado em tubos cônicos graduados e identificados. Posteriormente, a amostra destinada ao CMA foi processada a 5.000g durante 30 minutos para a separação do anel leucocitário, que foi aspirado e armazenado em tubos de criopreservação, mantidos a -20°C para posterior extração do DNA.

6.3. Cariótipo com Bandas G

As amostras de sangue periférico heparinizado foram submetidas à cultura de linfócitos T a curto prazo, conforme protocolos convencionais para à obtenção de metáfases. Após a cultura, a suspensão de células foi gotejada sobre vapor de banho-maria a 60°C, em lâminas limpas e desgorduradas. Para a análise do cariótipo por bandas G (método GTG), as lâminas foram envelhecidas à temperatura ambiente por sete dias e posteriormente tratadas em solução de tripsina (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia) diluída em PBS (Laborclin, Brasil) a 0,25% e coradas em solução de giemsa a 4% (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia). Todo o procedimento de cultura e preparo de lâminas para a cariotipagem dos casos seguiu os protocolos contidos em Verma e Babu (1995) Para a análise cromossômica, as metáfases foram capturadas sob microscopia de luz branca com o auxílio de um estação de cariotipagem contendo um microscópio Axioplan 2 Imaging[®] (Carl Zeiss, Alemanha) com platina motorizada controlada pelo Metafer[®] 3.4.0 (Metasystems Corporation, Alemanha) e analisadas com auxílio do software IKAROS[®] (Metasystems Corporation, Alemanha).

6.4. Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A partir de uma lâmina previamente preparada, conforme os procedimentos da citogenética convencional, escolheu-se uma região na qual se encontrava o material apropriado para a reação. Preferencialmente, escolheu-se as regiões onde se encontravam vários núcleos interfásicos e com metáfases bem espalhadas. O material na lâmina foi desidratado em soluções de álcool 70% por 1 minuto, álcool 85% por 1 minuto e álcool 100% por 1 minuto. Nas lâminas secas foi aplicado a sonda na região demarcada, coberta com lamínula limpa e desengordurada. E o sistema foi mantido ao abrigo da luz. A hibridização foi feita em um hibridizador (Hybrite[®], Abbott Molecular, Estados Unidos da América), obedecendo-se à seguinte programação: desnaturação por 3 minutos a 75°C e anelamento por 22 horas a 37°C. Após decorrido o tempo de hibridização, as lâminas foram lavadas em solução de lavagem a 72°C, sempre ao abrigo da luz e contra-coradas com DAPI. As imagens foram capturadas sob microscopia de epiluminação com o auxílio de um estação de cariotipagem contendo um microscópio Axioplan 2Imaging[®] (Carl Zeiss, Alemanha) e analisadas com auxílio do software ISIS[®] (Metasystems Corporation, Alemanha).

6.5. Extração e Quantificação das Amostras

Para a extração de DNA, foi utilizado o kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep[®] Mini Kit (GE Healthcare, Reino Unido). A quantificação da concentração de DNA foi realizada com auxílio de espectrofotômetro NanoVue[®] Plus (GE Healthcare, Reino Unido). Ambos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos sugeridos pelos fabricantes.

6.6. Análise Cromossômica por Microarranjos

A CMA foi conduzida em um GeneChip CytoScan HD[®] (Affymetrix – Estados Unidos da América), sendo a matriz de genotipagem mais abrangente para o genoma humano, capaz de fornecer um alto poder de investigação de variações genéticas estruturais. Esta matriz de genotipagem oferece a mais ampla cobertura e maior desempenho para a detecção de aberrações cromossômicas humanas. O CytoScan HD[®] possui $\geq 99\%$ de sensibilidade. Com mais de 2,6 milhões de cópias de marcadores polimórficos, a matriz CytoScan HD[®] tem sido reconhecida por sua cobertura e capacidade de comunicação com os bancos OMIM e genes RefSeq. A matriz CytoScan HD[®] incluiu aproximadamente 750 mil SNPs com mais de 99% de detecção, incluindo determinação de perda de heterozigose (LOH) e baixos níveis de mosaicismos.

6.6.1. Descrição do método de CMA

Esta metodologia consiste em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma, que é amplificada no ensaio. As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13^o nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido a localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip. O microarranjo foi desenhado especificamente para diagnóstico citogenético, incluindo ~2,7 milhões de marcadores de CNVs clinicamente relevantes baseados em 743.304 de marcadores de SNP e >1,9 milhões de marcadores não polimórficos, cobrindo todo o genoma humano de interesse médico.

A metodologia se iniciou com uma digestão do DNA amostral com uma enzima de restrição (*NspI*) fornecida pelo fabricante. Este passo requer aproximadamente 250 ng de DNA. Em seguida, o DNA digerido foi ligado a adaptadores específicos e, posteriormente, amplificados por PCR, mediante o uso de primers universais. O DNA fragmentado por digestão enzimática e amplificado foi marcado com biotina e hibridado no GeneChip® HD por 18 horas. Após a hibridização, os chips foram digitalizados no GeneChip® Scanner 3.000 7G (Affymetrix, Estados Unidos da América). Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos e capturados pelo software Chromosome Analysis Suite® 2.0 (Chas®, Affymetrix – Estados Unidos da América), que também serviu de interface para a análise dos dados. Os arquivos obtidos pelo escaneamento dos chips foram usados para se estabelecer os genótipos. As duas principais métricas de controle de qualidade do GeneChip™ HD array foram *Median Absolute Pairwise Difference* (MAPD) e SNP-QC, escores que aplicam para marcadores de número de cópias e SNP, respectivamente. Para o cenário do presente estudo foram usados os as métricas de controle de qualidade do chip: MAPD ≤ 0.25 (do inglês *Median Absolute Pairwise Difference* – Mediana Absoluta da Diferença Pareada) e de SNP-QC ≥ 15 (do inglês *SNP Quality Control* – Controle de Qualidade do SNP).

6.6.2. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs

A grande quantidade de informações disponibilizadas pelo uso do GeneChip® HD faz necessária análises complexas para o tratamento dos dados e obtenção de um resultado fidedigno. Para executar essa etapa, as análises genéticas e citogenéticas dos resultados fornecidos foram executadas no Software Chas®.

Usando-se o Chas®, foi possível investigar alterações estruturais ao longo do genoma.

Este programa permitiu identificar variações no número de cópias, perdas de heterozigose, duplicações e deleções de segmentos de DNA de regiões gênicas presentes nas amostras estudadas de modo comparativo, facilitando as interpretações dos resultados.

6.6.3. Alterações e herança e interpretação das CNVs

Na tentativa de explicar o fenótipo dos pacientes, o CMA foi realizado nos casos e seus respectivos progenitores, quando disponíveis, com o objetivo de se identificar a origem das alterações, se herdadas ou *de novo* ((PINTO, 2015; PEREIRA et al., 2014). Para a chamada das CNVs foi empregadas uma estratégia que permitiu a identificação de CNV de qualquer tamanho, cujos filtros foram estabelecidos para regiões contendo 50 marcadores para ganho e 25 marcadores para perda e uma limitação do tamanho do fragmento de 0 kb, denominada 50G25P-0kb. No presente estudo, as microduplicações foram denominadas de CNVg e as microdeleções de CNVp.

As CNVs encontradas em cada paciente foram confrontadas com bases de dados de controles saudáveis, incluindo o DGV do inglês *Database of Genomic Variants* – Banco de Dados de Variantes Genômicas, encontrado em <http://projects.tcag.ca/variationand>, a base de dados do CytoScan HD, fornecida pela Affymetrix e a base de dados de síndromes genéticas conhecidas como o DECIPHER do inglês *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources* – Banco de Dados de Imbalances Cromossômicos e Fenótipos em Humanos usando Recursos Ensemble, disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk>. As CNVs foram classificadas como patogênicas possivelmente patogênicas, neutras ou de significado clínico desconhecido, de acordo com Miller et al. (2010). As CNVs patogênica e provavelmente patogênica foram definidas de acordo com o seu tamanho, seu conteúdo gênico e sua diversidade gênica. A Figura 3 ilustra a interface do Software Chas[®], o instrumento de análise dos dados citogenômicos obtidos no presente estudo.

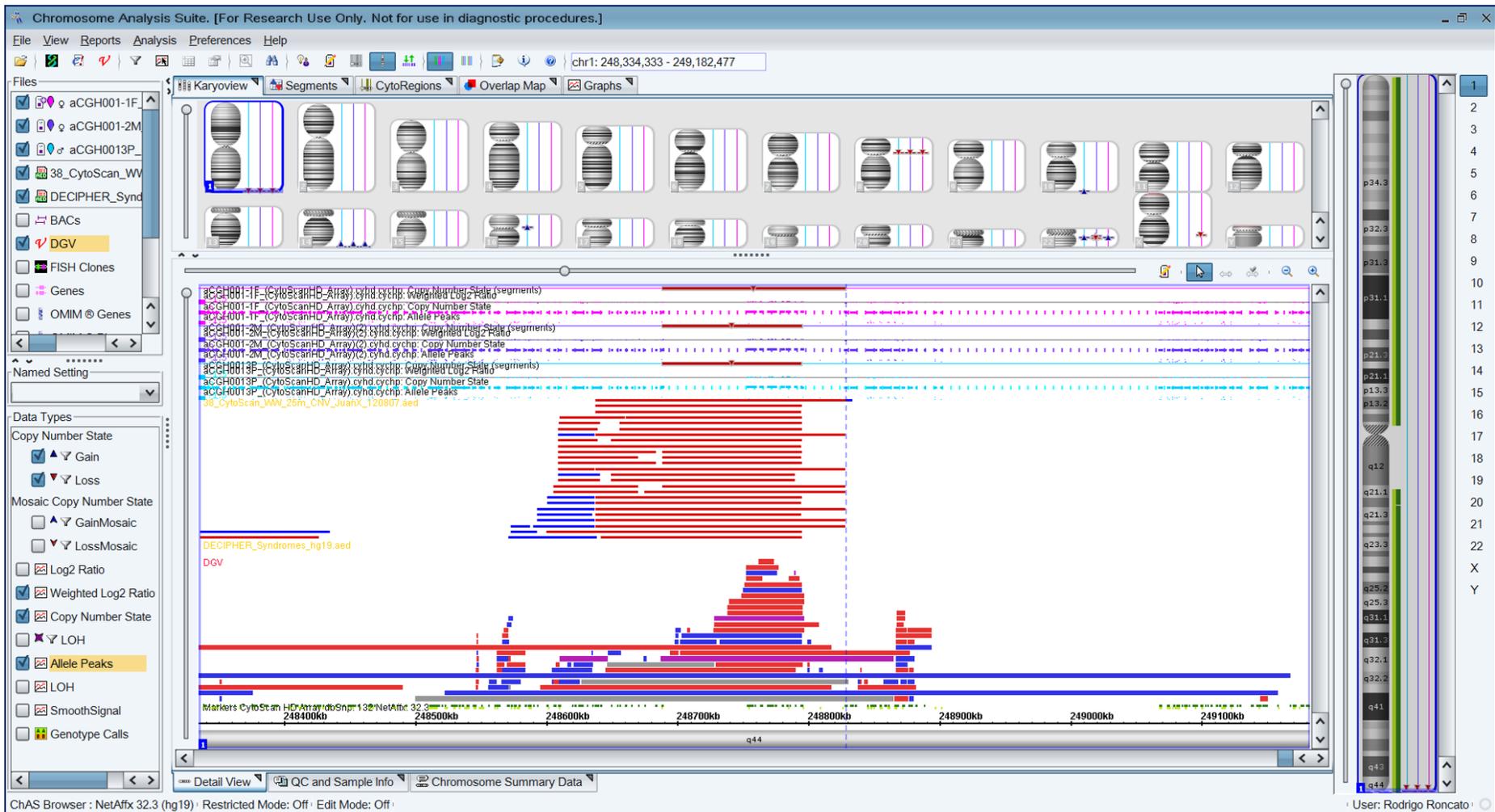


Figura 3. Interface do programa *Chromosome Analysis Suite*[®] 2.0 (Chas[®], Affymetrix – EUA), um software de análise dos dados citogenômicos contidos na matriz de genotipagem que permite a identificação de variações genética estruturais.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, apresentamos os resultados da investigação genética dos casos de indicação clínica para SD de pacientes atendidos na rede pública de saúde de Goiás no período de 1 de janeiro de 2011 a 31 de Dezembro de 2014. A **Tabela 1** apresenta o tamanho total da coorte de pessoas atendidas no período.

Tabela 1. Total de casos encaminhados ao NPR/LaGene por médicos assistentes da rede pública de atenção à saúde de Goiás (Brasil) para o diagnóstico genético, no período de janeiro de 2011 a Dezembro de 2014.

Indicação Clínica	Total	%*
Abortamento	17	5,3
Aconselhamento Genético	7	2,2
ADNPM ¹	23	7,1
Autismo/Síndrome do X-Frágil	6	1,9
Deficiência Intelectual	15	4,6
Doença Hematológica ²	15	4,6
Infertilidade	4	1,2
Malformações Múltiplas	6	1,9
Outros	18	5,6
Sem indicação clínica	9	2,8
Sexo Genético	5	1,5
Síndrome a Esclarecer	63	19,5
Síndrome de Down	79	24,5
Síndrome de Edward	5	1,5
Síndrome de Klinefelter/S. de Marfan	8	2,5
Síndrome de Patau	2	0,6
Síndrome de Turner	41	12,7
Total	323	100

* Frequência percentual; ¹Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; ²Leucemias e Síndrome Mielodisplásica.

No Estado de Goiás, no período estudado, foram atendidos pelo NPR/LaGene 323 pacientes para o diagnóstico genético de doenças genéticas, incluindo diagnóstico diferencial. Deste universo, 79 (24,5%) chegaram ao laboratório com a indicação de SD. Deste total, 62/79 (78,5%) foram portadores da trissomia livre, 2/79 (2,5%) de translocações robertsonianas e 2/79 (2,5%) de mosaicismo. Adicionalmente, 3 pacientes foram enviados ao laboratório com a indicação de “síndrome a esclarecer” e 1 paciente sem indicação clínica, que apresentaram a trissomia do 21 livre. A taxa de diagnóstico da SD observada no presente estudo estava em consonância com a literatura mundial. Embora o Brasil ainda careça de um sistema de registro populacional de doenças genéticas, os resultados do presente estudo

sugerem que a distribuição e prevalência da SD no Estado de Goiás reflete a prevalência observada nos países desenvolvidos, correspondendo a uma taxa de diagnóstico positiva $\leq 3\%$ e uma taxa de detecção $\geq 75\%$ (DEY, 2013; MORRIS & ALBERMAN, 2009). Embora os dados de um laboratório de referência não sejam úteis para se estimar a prevalência dos casos de SD em Goiás, a taxa de detecção (diagnóstico) da Síndrome no NPR/LaGene foi de 62/79 (78,5%), considerando as IC para SD ou de 66/83 (79,5%) quando se considerou todos os casos atendidos no período de janeiro de 2011 a Dezembro de 2014, em consonância com o esperado para as tendências de diagnóstico da SD no mundo.

Do total de pacientes recebidos no NPR/LaGene, 17/79 (21,5%) foram encaminhados com a indicação clínica de SD. No entanto, para este subgrupo o cariótipo apareceu sem alterações numéricas ou estruturais visíveis ao microscópio. Mediante contato ativo via telefone ou pessoalmente no laboratório, o grupo de casos foi convidado a participar do estudo que envolvia a investigação usando a tecnologia de análise cromossômica em microarranjos para tentar elucidar o diagnóstico dos probandos. A taxa de adesão ao presente estudo foi de 6/17 (35,0%). As famílias que concordaram em participar deste estudo assinaram ao TCLE. O restante do subgrupo, correspondendo a 11/17 (65,0%) dos casos recusaram-se a participar do estudo pois encontravam-se satisfeitos com os resultados previamente informados pelos médicos assistentes que atestavam “normalidade para o probando”.

Do total de 79 casos que apresentavam indicação clínica de SD, 65/79 (82,3%) dos casos foram elucidados pelo cariótipo com padrões de bandas GTG com resolução de 500 bandas, dispensando-se o emprego de outras metodologias. Considerando-se as dificuldades de acesso ao diagnóstico genético no Brasil e considerando que a oferta do cariótipo com bandas está previsto na Tabela de Procedimentos do SUS (<http://sigtap.datasus.gov.br>) para todo o território nacional, é importante que se promova a capacitação de recurso humano na área de citogenética no âmbito do SUS para que a metodologia possa efetivamente ser realizada nos laboratórios do sistema sob os princípios de equidade e universalidade, conforme previsto nas diretrizes apontadas pela Lei 8.080, de 19/09/1990 (BRASIL, 1990).

Na tentativa de investigar as possíveis causas que poderiam esclarecer o fenótipo observado nos 6 casos participantes deste estudo, a CMA foi realizada na busca de microduplicações e microdeleções. Os 6 casos foram apresentados na forma de relato de caso e os resultados da CMA encontram-se descritos na Tabela 2.

Paciente 1

Criança do sexo masculino. Filho de casal não consanguíneo, com 2 anos e 10 meses de idade quando da assinatura do TCLE, sendo o mais novo dos três filhos. A irmandade ainda incluía duas meninas saudáveis de 9 e 12 anos. Família sem história médica relevante. Família sem história prévia de abortamento. O probando apresentava altura de um metro e peso de 14Kg, hiperatividade, atraso na fala, crises de vômitos e pneumonia de repetição. No encaminhamento, o médico assistente apresentou a indicação clínica para SD. A Figura 3 apresenta imagens da face e mão do Paciente 1. O probando foi o resultado de uma gestação de evolução sem intercorrências com parto de 37 semanas e 3 dias. Na entrevista, a mãe informou o uso de medicamento para a maturação do pulmão, por uma semana antes do nascimento. Parto a termo por cesariana. Ao nascimento, obstetra relatou que o cordão umbilical estava enrolado no pescoço do recém nascido, APGAR 06/07 com cianose. Neonato permaneceu cerca de 10 dias na unidade de terapia intensiva. Os progenitores relataram não ser etilistas, nem tabagistas e nem fazem uso de drogas ilícitas. O pai possui hipertensão arterial e a mãe informou já ter usado antidepressivos e contra crises constantes de enxaquecas.

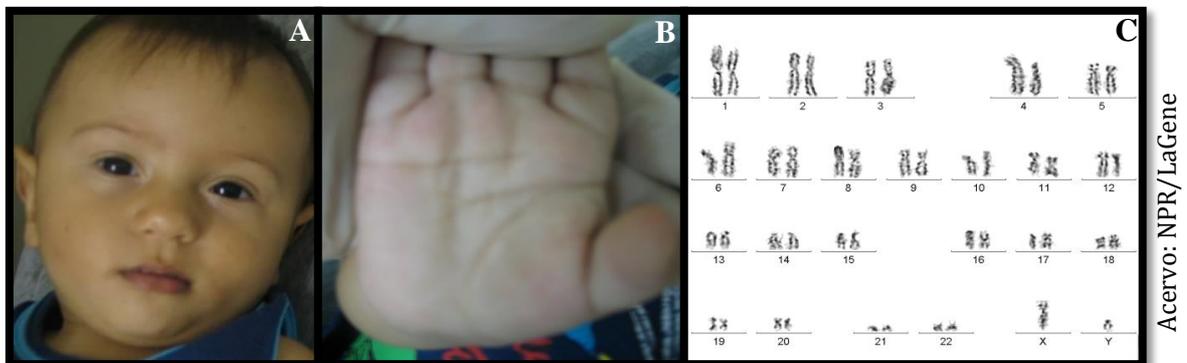


Figura 4. Paciente 1, encaminhado ao laboratório pelo Programa Estratégia Saúde da Família com indicação clínica de SD. A: Aspectos faciais, com ponte nasal larga e fenda palpebral oblíqua, dolicocefalia e micrognatia leves; B: Mão curta e larga; C: Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Devido à presença de um ganho na região 10p14 (64.765kb) ter sido observado pelo CMA. Uma investigação por FISH foi realizada para a validação dos achados de CMA (Figura 5). De forma semelhante, devido à presença de uma microdeleção na região 7p11.23 (49.008kb) ter sido observado pelo CMA, com a utilização do filtro otimizado no NPR, esta região poderia estar associada à Síndrome William-Beuren. Devido ao reduzido tamanho das CNVs, o FISH não se mostrou útil para a validação dos achados de CMA.

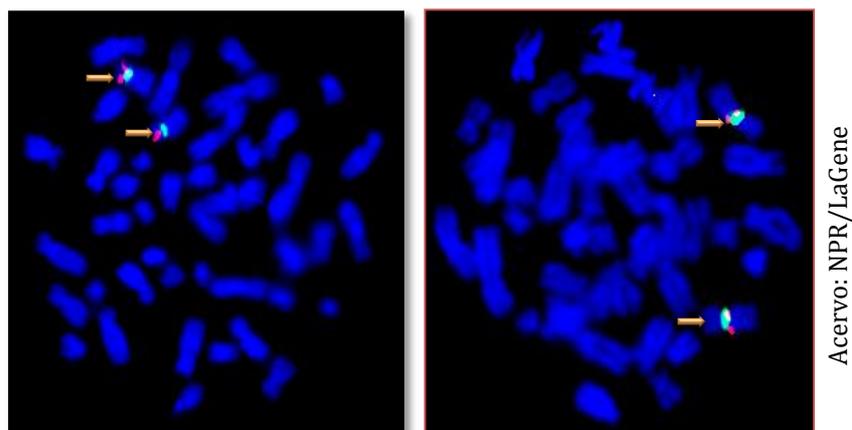


Figura 5. Hibridização fluorescente *in situ* de probando com sinais fenotípicos sugestivos de SD, sem alterações cariotípicas. A. Metáfase hibridizada com uma sonda para a região 10p14 do cromossomo 10 marcada em vermelho e uma sonda centromérica para 10p11.1-q11.1, marcada em verde. Setas assinalam os sinais fluorescentes, indicando o local da hibridização das sondas; B. Metáfase hibridizada com um sonda marcada em vermelho para o cromossomo 7, correspondendo a q11.23 para o diagnóstico da Síndrome de William-Beuren, e em verde para a região centromérica. Setas assinalam o local da hibridização das sondas. Aumento 100X.

Os resultados da CMA (Tabela 1) mostraram 2 CNVg e 2 CNVp no genoma do Paciente 1. As microduplicações estavam localizadas em 3q13 e 12q13, enquanto que as microdeleções estavam em 22q13 e Xp22. Exceto pela microdeleção em 22q13, as outras CNVs não tiveram nenhum significado clínico, embora tenham sido originadas como mutações novas no genoma do probando. No entanto, embora muito pequena (8,7kp), a microdeleção em 22q13 incluiu a deleção parcial do gene *SHANK3*, correspondendo a uma deleção proximal do gene, com prejuízo dos 3 primeiros éxons de um conjunto de 22 éxons (SHENG & KIM, 2000).

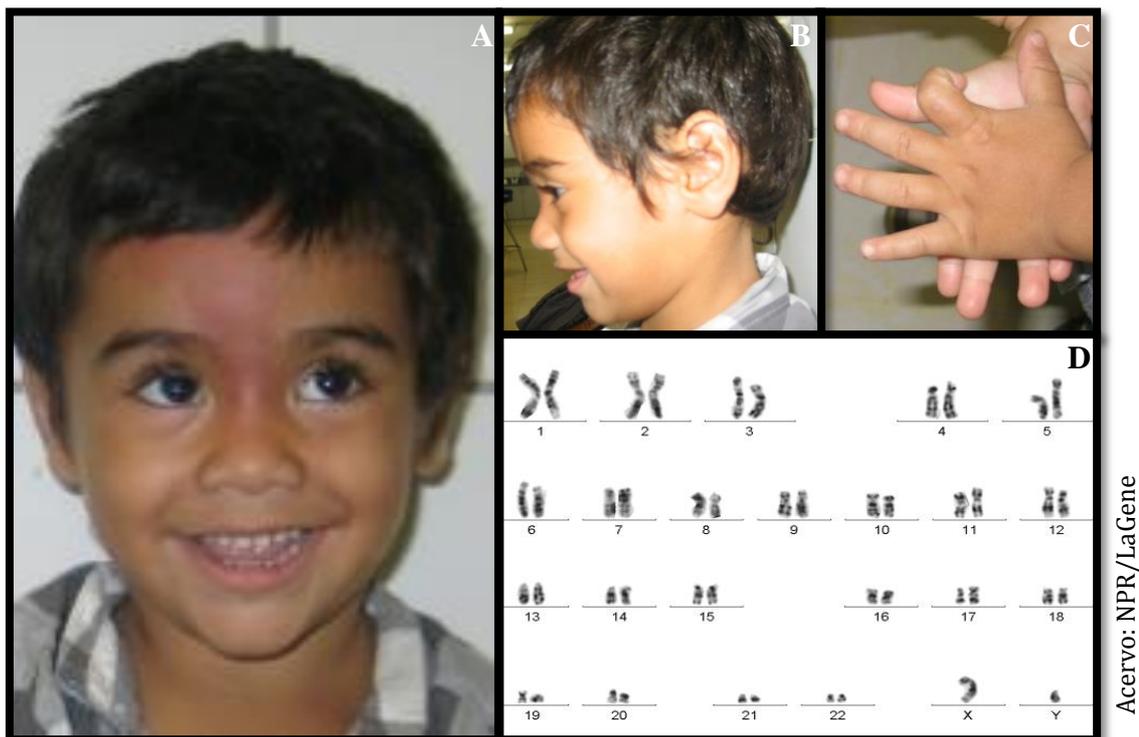
O gene *SHANK3*, da família SHANK, é responsável pela codificação do terceiro domínio de repetição múltipla da anquirina. As proteínas SHANK, como a anquirina, promovem a ligação do esqueleto protéico à bicamada lipídica através de interações com proteínas de transmembrana e são importantes para gerar densidade pós-sináptica, organiza os canais de ions, organiza o citoesqueleto e auxilia nas vias de sinalização de proteína G-acopladas. A família SHANK também auxilia na formação de sinapses e na maturação dos dendritos (SHENG & KIM, 2000). Estudos funcionais do gene *SHANK3* comprovaram que a haploinsuficiência devido a perda de uma cópia funcional do gene, seja por deleção total ou parcial do gene ou por inativação devido a mutações de ponto, causam uma variante monogênica do Transtorno do Espectro Autista (TEA). A frequência de mutações do gene

SHANK3 foi estimada em 0,5% dos casos de TEA, podendo ser observado em cerca de 2,0% dos casos com DI moderada ou severa (ANGARITA et al., 2014). Kolevzon e colaboradores (2014) relataram que a perda de função do gene *SHANK3* é um componente crítico e suficiente para causar a Síndrome de Phelan-McDermid (SPM; MIM 606232).

Prasad e colaboradores (2000) relataram que a deleção terminal de 22q13 resultava numa síndrome com fenótipo reconhecível, que incluía hipotonia neonatal, atraso global do desenvolvimento, atraso na fala, comportamento autista e sinais dismórficos leves. Phelan e colaboradores (2001) compararam uma coorte de pacientes com a síndrome da deleção de 22q13 e relataram alguns sinais menos frequentes em associação com o fenótipo descrito anteriormente, que incluía, entre outras, reduzida tolerância à dor, displasia ungueal, dolicocefalia, ptose e pregas epicânticas oblíquas. No contexto acima apresentado, o Paciente 1 apresentou alguns sinais fenotípicos semelhantes ao descrito por Prasad e colaboradores (2000) e Phelan e colaboradores (2001). Desta forma, a haploinsuficiência de *SHANK3* no probando devido a deleção proximal do gene observada por CMA seria suficiente para estabelecer o diagnóstico de SPM. Kolevzon e colaboradores (2014) sugeriram que para os casos de SPM, a CMA deve ser o teste de escolha, pois o método permite a identificação de deleções e arranjos estruturais envolvendo 22q13, resultando em CNVp de tamanhos variáveis, que são as mutações mais frequentes na SPM. Alguns sinais fenotípicos apresentados pelo probando, como a presença das pregas epicânticas oblíquas e o ADNPM, são semelhantes aos sinais observados na SD, que foi o provável fator de confundimento da hipótese diagnóstica, inicialmente referenciada ao laboratório.

Paciente 2

Criança do sexo masculino, que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 2 anos e 6 meses de idade (Figura 6). Altura de 94cm e peso de 14Kg. Filho de casal não consanguíneo. Probando possui uma irmã (6 anos) e 3 irmãos (4, 7 e 13 anos). Família sem história médica relevante e sem história prévia de abortamento. Paciente apresentou claudicação, com comprometimento do membro inferior esquerdo e mão esquerda em garra. Queixa-se de dor ao deambular e teve atraso no desenvolvimento motor. Gestação de evolução sem intercorrências, com parto normal com 39 semanas e 3 dias. O pai relatou que não fuma, mas é etilista e faz uso crônico de crack há mais de 10 anos e também consumiu maconha. A mãe é tabagista e etilista, mas relatou que não fumou e nem consumiu álcool durante a gestação. A mãe também relatou ser usuária de crack há mais de 10 anos e que fez uso da substância durante a gestação.



Acervo: NPR/LaGene

Figura 6. Paciente 2, encaminhado ao laboratório pela nutriologia com suspeita de trissomia 21. A: Aspectos faciais com ponte nasal larga; B: Implantação baixa da orelha; C: Mão esquerda em garra; D. Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Os resultados da CMA (Tabela 2) revelaram 2 CNVg e 4 CNVp no genoma do Paciente 2. As microduplicações estavam localizadas em Xq13 e Xq24, enquanto que as microdeleções estavam em 2q33, Xq26, Xq27 e Xq28. Nenhuma das alterações genômicas tiveram significado clínico relevante, embora tenham sido originadas como mutações novas no genoma do probando. A CNVg em Xq24 continha o gene *SLC25A43*, que foi previamente descrito como um gene altamente expresso no sistema nervoso central (HAITINA et al., 2006). No entanto, esta CNV é comumente encontrada na população saudável e encontra-se depositada no banco de dados do Cytoscan® HD Array. Conseqüentemente, a escassez de informações acerca do papel biológico do gene *SLC25A43*, coloca este achado na categoria de significado clínico incerto.

A história familiar relatada de uso crônico de crack, inclusive durante a gestação, pode consubstanciar os achados clínicos da criança. Riezzo e colaboradores (2012) relataram uma incidência elevada de malformações cardíacas e cerebrais na progênie de mães que faziam uso crônica de cocaína e seus derivados.

Paciente 3

Criança do sexo feminino, que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 3 anos e 6 meses de idade (Figura 7). Altura de 102 cm e peso de 17Kg. Filha de casal não consanguíneo. Probando possui uma irmã de 6 anos. Famílias materna e paterna com história de hiperatividade, dificuldade de aprendizagem e demência. Família sem história prévia de abortamento. A criança apresentou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, agressividade, agitada e muito nervosa. Engatinhou com 1 ano de idade e começou a falar aos 3 anos. Foi detectado sopro cardíaco tanto clinicamente quanto pelo ecocardiograma. A mãe informou que durante a gestação teve diabetes gestacional e hipertensão, que evoluiu para parto cesariana com ~34 semanas. A mãe relatou ter deficit de atenção e de aprendizagem. O pai não é etilista e nem tabagista, mas relatou uso de remédio controlado (fenobarbital) para controlar disritmia cerebral. A mãe não é tabagista nem etilista.

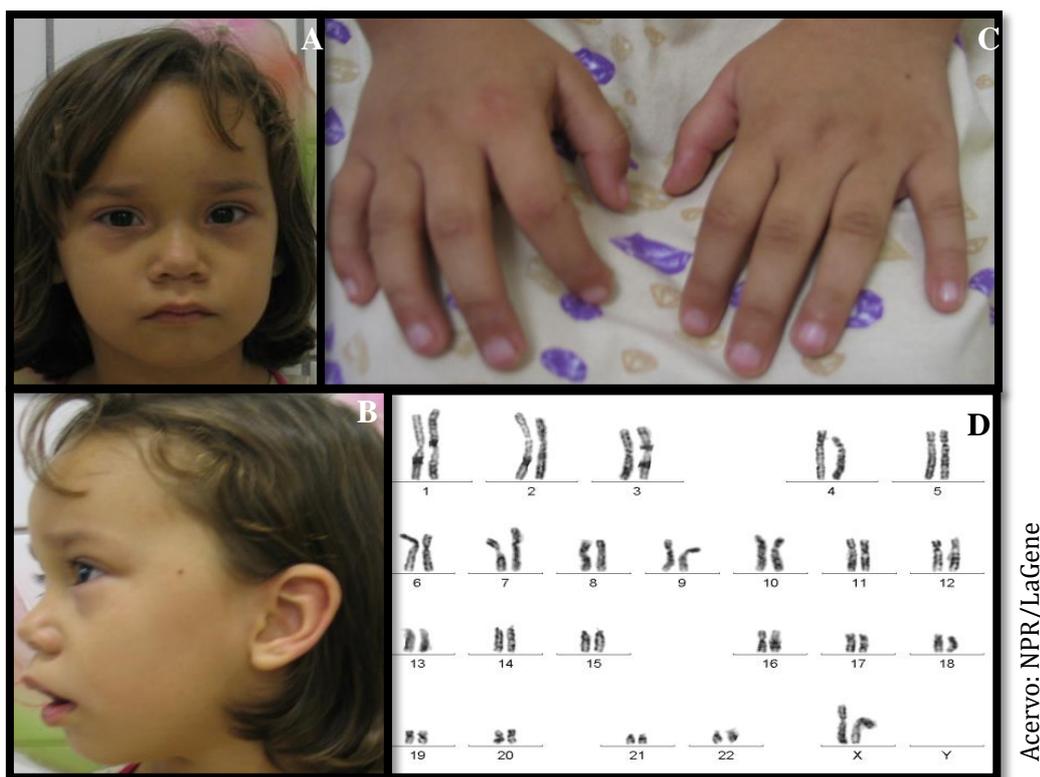


Figura 7. Paciente 3, encaminhada ao laboratório pelo Programa Estratégia da Saúde da Família com suspeita de SD. A: Aspectos faciais com retrognatia; B: Implantação baixa da orelha; C: mãos curtas e largas, com clinodactilia de D5. D. Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Os resultados da CMA (Tabela 2) revelaram 2 CNVg e 3 CNVp no genoma do Paciente 3. As microduplicações estavam localizadas em Xq24 e Xq27, enquanto que as microdeleções estavam em 22q13, Xp22 e Xq27. A exceção da CNVp em 22q13, nenhuma

das alterações genômicas tiveram significado clínico relevante, embora tenham sido originadas como mutações novas no genoma do probando.

A CNVg em Xq24 continha o gene *SLC25A43*, que foi previamente descrito como um gene altamente expresso no sistema nervoso central (HAITINA et al., 2006). No entanto, esta CNV é comumente encontrada na população saudável e encontra-se depositada no banco de dados do Cytoscan[®] HD Array. Consequentemente, a escassez de informações acerca do papel biológico do gene *SLC25A43*, coloca este achado na categoria de significado clínico incerto. Por outro lado, gene *AGL12*, localizado em 22q13, que codifica para a alpha-1,6-mannosyltransferase, foi encontrado totalmente deletado. A proteína AGL12 catalisa a adição de resíduos de manose em precursores de oligossacarídeos na consecução da via de glicosilação. As mutações do gene *AGL12* já foram implicadas em uma desordem congênita de glicosilação tipo Ig (CDG-Ig, do inglês, *Congenital Disorder of Glycosylation type Ig*) e também em associação com o retardo psicomotor familiar (JAEKEN & CARCHON, 2004; GRUBENMANN et al., 2002; JAEKEN et al., 1980). Apesar dos achados acerca da deleção de *AGL12*, a grande variação clínica dos fenótipos associados às CDGs torna difícil o diagnóstico laboratorial preciso destas condições. Sobretudo, porque são estimados cerca de 500 genes potencialmente associados ao distúrbio de glicosilação (GRUBENMANN et al., 2002).

Paciente 4

Criança do sexo feminino (Figura 8), que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 1 ano e 26 dias de idade. Não foram relatados o peso e a altura do probando. Filha de casal não consanguíneo. Probando possui uma irmã (4 anos), que possui um dimorfismo facial afetando um dos olhos. Relatado que o probando é produto de uma gestação gemelar, sendo o segundo gêmeo do sexo feminino e natimorto. A mãe informou que durante a gestação teve uma queda da própria altura no 5^o mês de gestação e que, em consequência, o probando teve hemorragia cerebral. Criança apresenta malformação do cérebro, displasia bronco-pulmonar e persistência da veia cava superior e do forame oval pérvio. O rompimento da bolsa amniótica ocorreu espontaneamente na 32^a semana e o parto evoluiu para cesariana, que ocorreu 3 dias após o rompimento da bolsa. Recém-nascido apresentou sintomatologia de sofrimento fetal, APGAR 08/09 com cianose e um quadro de meningite, que evoluiu para sepse, permanecendo 2 meses na unidade de terapia intensiva. Criança apresenta crises convulsivas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Criança sentou aos 9 meses, engatinhou aos 12 meses e não fala. Família sem história prévia de

abortamento. Família materna com história de demência e paterna com esquizofrenia. Os progenitores não são etilistas e nem tabagistas. A mãe relatou uso de maconha.

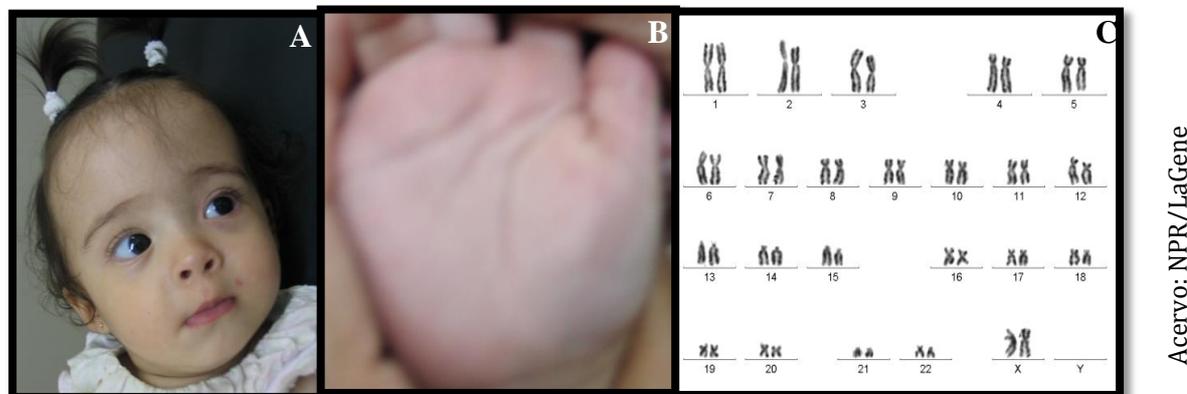


Figura 8. Paciente 4, encaminhada ao laboratório pela pediatria, com sinais sugestivos de SD. A: Aspectos faciais com discreta fenda palpebral oblíqua e ponte nasal larga; B: Palma da mão sem sinais relevantes; C: Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Os resultados da CMA (Tabela 2) revelaram 3 CNVp no genoma do Paciente 4. As microdeleções estavam localizadas em 7p14, Xp22 e Xq28. A exceção da CNVp em Xq28, nenhuma das alterações genômicas tiveram significado clínico relevante, embora tenham sido originadas como mutações novas no genoma do probando. A CNVp em Xq28 continha o gene *MAGEA8*, um gene da família A8 de antígenos do melanoma, previamente descrito como um gene expresso no cérebro e em associação com comportamento autista (COROMINAS et al., 2014). Nenhuma outra associação descrita para esta variante fenotípica foi encontrada na literatura. Embora a CNVp observada tenha um potencial patogênico, a escassez de informações acerca das possíveis desordens causadas por uma deleção deste gene não permite elucidar o diagnóstico para esta criança.

Paciente 5

Criança do sexo masculino (Figura 9), que no momento da assinatura do TCLE apresentava 9 meses de idade, pesando 9,5Kg. Não foi relatada a altura. Filho único de casal não consanguíneo. Gestação sem intercorrências, que evoluiu para parto cesariana na 39^a semana por opção materna. Recém-nascido apresentou APGAR 09/10. O probando é hipotônico com pele flácida e elástica. Criança apresentava atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, firmou a cabeça aos 5 meses, mas não engatinha e nem fala. Família sem história prévia de abortamento. Família materna com história de doença mental, malformações craniais e pé torto congênito. Família paterna com história de malformação de membros inferiores. Os

progenitores não são etilistas e nem tabagistas.

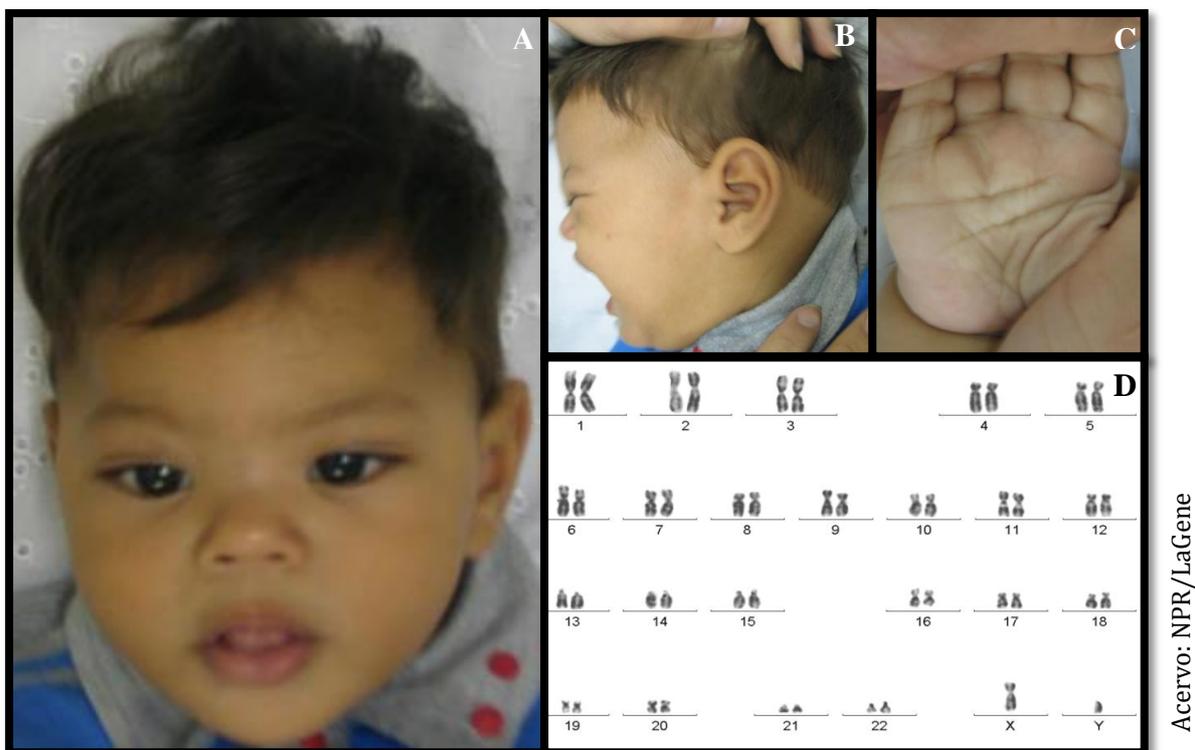


Figura 9. Paciente 5, encaminhado ao laboratório pela pediatria com sinais sugestivos da SD. A: Aspectos faciais, incluindo ponte nasal larga, epicanto e fenda palpebral oblíqua; B: Pele frouxa na nuca; C: Mão curta e larga; D: Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas.

Os resultados da CMA (Tabela 2) revelaram 5 CNVp no genoma do Paciente 5. As microdeleções estavam localizadas em 3p21, 3q28, Xp21, Xq25 e Xq28. A exceção da CNVp em Xq21.3, nenhuma das alterações genômicas tiveram significado clínico relevante, embora tenham sido originadas como mutações novas no genoma do probando. A microdeleção observada resultou na deleção parcial, afetando intersticialmente o íntron 2 do domínio de imunoglobulina do gene *ILIRAPLI*. As mutações e deleções de *ILIRAPLI* já foram observadas em pacientes com deficiência intelectual ligada ao X não síndrômica, caracterizada por um espectro de deficiências neurológicas e cognitivas, em alguns casos com comportamento autista (PITON et al., 2008).

Relatos da literatura indicam que as mutações de *ILIRAPLI* parecem ter um comportamento de penetrância incompleta nas mulheres. A clínica dos casos relatados é bastante variável. Geralmente, os afetados exibem como sinais fenotípicos mandíbula proeminente, estrabismo, hiperextensão das articulações e sinofrismo (FRANEK, 2011). Embora a CNVp observada tenha um potencial patogênico, os dados do CMA não permitiram

elucidar o diagnóstico para o probando.

Paciente 6

Criança do sexo feminino (Figura 10), que no momento da assinatura do TCLE apresentava 1 ano e 21 dias de idade. Altura de 75cm e peso de 8Kg. Filha única da progenitora, mas não há registros sobre o progenitor. Gestação sem intercorrências, que evoluiu para parto normal na 33^a semana. Recém-nascido apresentou cianose e dificuldade de sucção. O probando apresentava atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Família sem história prévia de abortamento. Família materna sem história médica relevante. A mãe não é tabagista, mas faz consumo ocasional de bebida alcoólica.

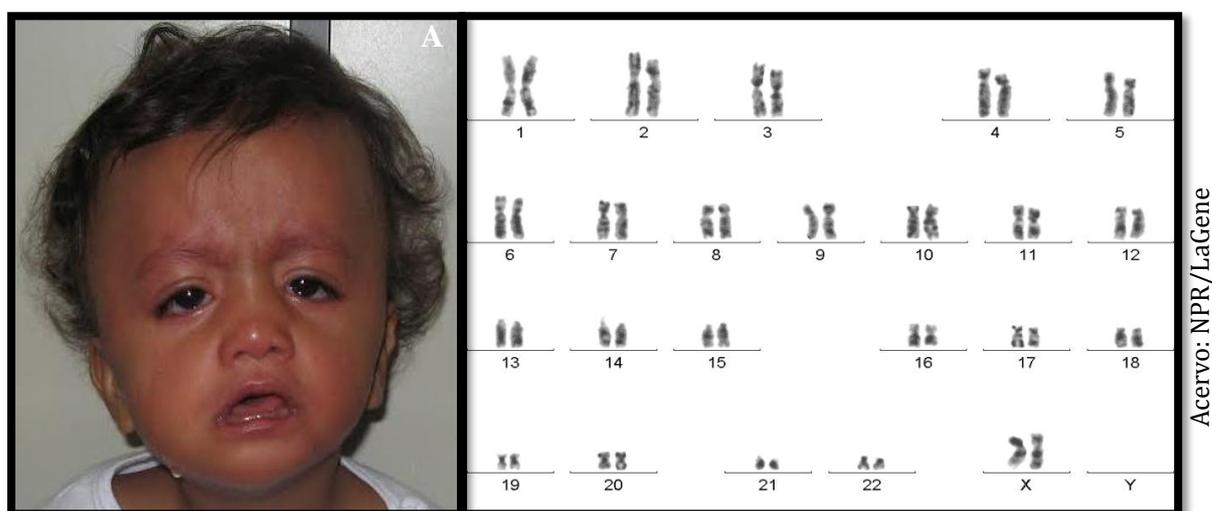


Figura 10. Paciente 6, encaminhada ao laboratório pela pediatria, com indicação clínica de SD. Probando apresentado moderada dismorfia facial, incluindo ptose, fenda palpebral oblíqua, ponte nasal larga, micrognatia, proeminência frontal, baixa implantação da orelha e dolicocefalia leve.

Os resultados da CMA (Tabela 2) revelaram 3 CNVg e 8 CNVp no genoma da Paciente 6. As microduplicações estavam localizadas em 8p13, Xq26 e Xq28, enquanto que as microdeleções estavam em 7q35, 10q23, 16p13, 22q12, Xq11, Xp22, Xq27 e Xq28. A exceção da CNVp em 22q13, nenhuma das alterações genômicas tiveram significado clínico relevante. A CNVg em 7q35 continha o gene *CNTNAP2*, que codifica para uma proteína da família das neurexinas que atuam como moléculas de adesão e receptores no sistema nervoso dos vertebrados. A CNVp observada pelo CMA incluiu uma deleção intersticial no íntron 3 do gene, que contém 25 éxons.

As mutações relatadas para o gene *CNTNAP2* resultam em susceptibilidade ao autismo (MIM 612100) e sinais semelhantes aos da Síndrome de Pitt-Hopkins (MIM

610042). Porém, o fenótipo do probando não corresponde aos fenótipos previamente relatados. A escassez de informações, a extensa variabilidade dos fenótipos e os achados da CMA não foram suficientes para a elucidação diagnóstica do caso.

Os resultados globais da CMA do presente estudo indicaram uma taxa de detecção de ~17% (1/6) em consonância com as taxas relatadas na literatura que oscilam em torno de 20% (PEREIRA et al., 2014; BATTAGLIA et al., 2013; HOWELL et al., 2013). Nossos resultados estão em consonância com os relatórios recentes de que aproximadamente 15 a 20% dos casos de DI apresentam CNV submicroscópicas que são relevantes para a elucidação do diagnóstico (PEREIRA et al., 2014; MILLER et al., 2010; GIJSBERS et al., 2009; ZAHIR et al., 2007). No total, para o grupo de 6 pacientes, foram observadas 36 CNVs, sendo 25,7% (9/35) de microduplicações e 74,3% (26/35) de microdeleções. Nenhuma CNV patogênica foi encontrada entre as CNVg, corroborando com os achados recentes que sugerem que a perda genômica é mais deletéria para o fenótipo que o ganho genômico. A patogenicidade de uma CNV geralmente é causada pela haploinsuficiência de um ou mais genes contidos na região (MCLYSAGHT et al., 2013).

Recentemente, a detecção de alterações cromossômicas submicroscópicas em pacientes com DI tem permitido uma melhora significativa na delimitação das regiões do genoma que estão associadas com o desenvolvimento e a função do cérebro. No entanto, as regiões cromossômicas identificadas, geralmente, contêm vários genes e elementos reguladores, que dificulta a compreensão das correlações genótipo-fenótipo (KASHEVAROVA et al, 2014). Neste contexto, os casos com fenótipo variável, que clinicamente podem apresentar de uma leve dificuldade de aprendizagem a malformações congênitas graves e com características que se sobrepõem com as síndromes bem reconhecidas, representam o principal desafio diagnóstico na era genômica. O presente estudo relatou a experiência da avaliação de 6 probandos com fenótipos complexos, que apresentavam características em comum com a SD. No entanto, embora o exame físico tenha gerado a hipótese clínica, os testes laboratoriais de citogenéticas não foram úteis para a resolução diagnóstica. Para cerca de 83,3% (5/6) dos casos apresentados no presente estudo ainda se faz necessário o uso de metodologias de maior resolução como o sequenciamento de exomas ou o sequenciamento de nova geração para tentar elucidar a alteração genômica subjacente aos achados fenótipos observados, que devem ser confirmados com estudos funcionais e epidemiológicos das variantes raras de fenótipos complexos.

Em relação aos fenótipos complexos, descritos no presente estudo e para os quais não se estabeleceu um diagnóstico da causa subjacente aos sinais dos probandos, foi possível

concluir que nenhum deles foi afetado pela SD. Uma vez que, de todas as alterações genômicas identificadas pelo CMA, nenhuma delas afetou a DSCR (do inglês, *Down Syndrome Critical Region*), uma região restrita ao cromossomo 21 (HSA21) e que é responsável pelos diferentes sinais fenotípicos observados na SD (DEY, 2013).

Conforme discutido por Howell e colaboradores (2013), apesar dos grandes avanços no diagnóstico usando estratégias de neuroimagem, moleculares e metabólicas, uma proporção significativa de crianças com ADNPM com ou sem sinais dismórficos permanecerão sem um diagnóstico conclusivo da causa subjacente ao fenótipo clinicamente reconhecido. Shao e colaboradores (2008) ressaltaram a importância de se continuar as investigações científicas mesmo na ausência de um diagnóstico específico para os casos de fenótipos complexos. Neste casos, a exclusão de alterações genômicas tem um impacto imediato em termos de aconselhamento genético e perspectivas de um melhor prognóstico para o paciente, além de possibilitar a identificação das regiões gênicas potencialmente envolvidas nos fenômenos biológicas subjacente ao agravo à saúde de uma pessoa (ZILINA, 2014; MILLER et al., 2010; PROBST et al., 2007). No presente estudo, mesmo não apresentando alterações sugestivas para SD, os casos analisados apresentaram diversas alterações identificadas pelo CMA, que em conjunto possuem potencial para alinhar estudos futuros de correlação genótipo-fenótipo e estudos funcionais que possam explicar o agravo à saúde observado nos probandos para orientar as tomadas de decisões por parte famílias e dos profissionais de saúde que auxiliam e cuidam e assinem as pessoas afetadas por doenças genéticas e genômicas.

Tabela 2. Achados moleculares de 6 probandos, com sinais fenotípicos sugestivos de Síndrome de Down e cariótipos sem alterações estruturais ou numéricas, da análise cromossômica por microarranjos usando chip de DNA de alta densidade em uma coorte atendida pela rede pública de saúde de Goiás (Brasil).

Caso	Idade	Sexo	CNV	Citobanda	Tamanho (kb)	Número de Marcadores	Nomenclatura do microarranjo	Nº de genes	Genes Mórbidos **	Origem	Interpretação	
1/CMA004	2a	M	Ganho	3q13.33	6,7	53	3q13.33 (121.789.938-121.796.728)x3	1		<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>	
			Ganho	12q13.13q13.2	517,5	79	12q13.13q13.2 (54.462.464-54.980.062)x3	19		<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>	
			Perda	10q11.22	38,2	62	10q11.22 (47.059.172-47.097.390)x1	2		<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>	
			Perda	22q13.33	8,7	32	22q13.33 (51.106.757-51.115.526)x1	1		<i>SHANK3</i>	<i>de novo</i>	Patogênico
			Perda	Xp22.33	4,6	40	Xp22.33 (2.553.548-2.558.186)x1	1			<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
2/CMA028	2a6m	M	Ganho	Xq13.3	3,5	58	Xq13.3(75.608.864-75.612.388)x2	0	*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>	
			Ganho	Xq24	16,5	72	Xq24(118,552,621-118,569,156)x2	1		<i>SLC25A43</i>	<i>de novo</i>	SCI
			Perda	2q33.2	16,7	28	2q33.2(203,324,411-203,341,172)x1	1			<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq26.1	1,3	27	Xq26.1(129,666,861-129,668,174)x0	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq27.1	4,2	40	Xq27.1(139,804,197-139,808,475)x0	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq28	33,9	28	Xq28(154,912,941-154,946,888)x0	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
3/CMA039	3a6m	F	Ganho	Xq24	16,5	72	Xq24(118,552,621-118,569,156)x3	1		<i>SLC25A43</i>	<i>de novo</i>	SCI
			Ganho	Xq27.1	1,6	51	Xq27.1(138,438,958-138,440,623)x3	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	22q13.33	31,8	68	22q13.33(50,295,037-50,326,883)x1	2		<i>ALG12</i>	<i>de novo</i>	Provavelmente Patogênico
			Perda	Xp22.32	41,2	30	Xp22.32(5,575,701-5,616,964)x1	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq27.1	2,8	42	Xq27.1(139,803,384-139,806,257)x1	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
4/CMA046	1a26d	F	Perda	7p14.1	60,8	78	7p14.1(38,295,931-38,356,732)x1	1			<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xp22.33	19,7	84	Xp22.33(2,449,602-2,469,328)x1	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq28	204,5	350	Xq28(148,884,728-149,089,325)x1	1		<i>MAGEA8</i>	<i>de novo</i>	Provavelmente Patogênico
5/CMA065	9m	M	Perda	3p21.1	7,4	40	3p21.1(53,031,722-53,039,204)x1	1			<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	3q28	29	36	3q28(190,869,466-190,898,916)x1	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xp21.3	14,0	56	Xp21.3(29,160,655-29,174,711)x0	1		<i>IL1RAPL1</i>	<i>de novo</i>	Provavelmente Patogênico
			Perda	Xq25	5,5	40	Xq25(128,659,903-128,665,414)x0	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq28	33,9	28	Xq28(154,912,941-154,946,888)x0	0		*	<i>de novo</i>	<i>Benigno</i>

			Ganho	8p13.3	42,1	80	8q13.3(73,598,461-73,640,595)x3	1		NA	<i>Benigno</i>
			Ganho	Xq26.3	20	52	Xq26.3(134,870,852-134,891,198)x4	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Ganho	Xq28	10,2	70	Xq28(147,765,026-147,775,292)x3	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Perda	7q35	21,3	60	7q35(146,552,052-146,573,427)x1	1	<i>CNTNAP2</i>	NA	Provavelmente Patogênico
			Perda	10q23.3	77,7	72	10q23.31(90,853,445-90,931,209)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>
6/CMA031	1a21d	F	Perda	16p13.3	6,2	40	16p13.3(6,119,560-6,125,817)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Perda	22q12.3	47,3	26	22q12.3(36,442,081-36,489,472)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Perda	Xp22.33	4,5	41	Xp22.33(2,464,819-2,469,328)x1	1		NA	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq11.2	174,5	64	Xq11.2q12(64,438,946-64,613,511)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq27.1	2,0	38	Xq27.1(139,804,197-139,806,257)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>
			Perda	Xq28	8,5	44	Xq28(147,317,018-147,325,589)x1	0	*	NA	<i>Benigno</i>

* Nenhum gene na região analisada

** Genes relacionados à DI/Autismo

SCI=Significado clínico incerto; NA=não avaliado

8. CONCLUSÃO

Os resultados previamente apresentados e discutidos nesta dissertação permitem concluir:

1. A taxa de detecção de alterações genômicas para o diagnóstico dos casos apresentados foi de ~17%.
2. Nenhum dos probandos apresentou a SD, conforme sugerido pela indicação clínica, pois em nenhum caso houve o envolvimento da DSCR localizada no cromossomo 21.
3. A taxa de diagnóstico da SD no NP/LaGene foi de 78,5%, em consonância com o esperado para as tendências de diagnóstico desta síndrome no mundo.
4. Pela CMA foi possível estabelecer a correlação genótipo-fenótipo para um caso, no qual foi observado uma deleção proximal do gene *SHANK3*, cuja haploinsuficiência é responsável pela Síndrome de Phelan-McDermid.
5. A análise dos progenitores permitiu estabelecer a transmissão das CNV e identificar aquelas que ocorreram *de novo*.
6. No presente estudo foram identificados 4 genes que podem estar contribuindo com os fenótipos dos probandos, que merecem estudos detalhados de genômica estrutural e funcional, que foram *AGL12*, *MAGEA8*, *ILIRAPL1* e *CNTNAP2*, localizados em 22p13, Xq28, Xp21 e 7q35, respectivamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGARITA-JAMES, N.; KOUCHAKPOUR, H.; PANERAI, R.B.; SIMPSON, D.M. Optimising the assessment of cerebral autoregulation from black box models. *Medical Engineering & Physics*, 36(5):602-612, 2014.
2. BALDWIN, E.; LEE J.; BLAKE, D.; BUNKE, B.; ALEXANDER, C.R.; KOGAN, A.L.; LEDBETTER, D.H.; MARTIN, C.L. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genetics in Medicine*, 106:415-429, 2008.
3. BATTAGLIA, A.; DOCCINI, V.; BERNARDINI, L.; NOVELLI, A.; LODDO, S.; CAPALBO, A.; FILIPPI, T.; CAREY, J.C. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *European Journal of Paediatric Neurology*. 17(6):589-599, 2013
4. BRAMMER, S.P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm. Acessado em: 20/02/2015.
5. BRASIL, DISRITO FEDERAL. Lei 8.080 de 19/09/1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Ministério da Saúde/Conselho nacional de Saúde.
6. BRASIL. Cuidados de saúde às pessoas com Síndrome de Down. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília : Ministério da Saúde, 30 p. 2012.
7. BRASIL. Diretrizes de atenção à pessoa com Síndrome de Down. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília : Ministério da Saúde, 62 p. 2013.
8. BRAVO, N.C.C.; ALDANA, C.T.S.; ARBELAEZ, H.E.M. Correlación genotipo-fenotipo y análisis molecular en pacientes con síndrome Down. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(3):295-305, 2012.
9. CHAVES, T.F. & NICOLAU, L.S. Citogenética e cariotipagem humana. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 4:20-25, 2013.
10. CONASS - Política nacional de atenção integral em genética clínica. NOTA TÉCNICA 05-2007. Disponível em: www.sbgm.org.br/pdfs/NT05-07.pdf. Acessado em: 20/02/2014. Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde.
11. DEY, Subrata Kumar (Org). *Sown Syndrome*. Croatia/European Union: InTech, 2013. 261 p.
12. DOWN, J.L. Observations on an Ethnic Classification of Idiots. *London Hospital Reports*, 259-262, 1866.
13. FIGUEIREDO, A.E.C.; FIGUEIRAS, A.C.M; MORAES, A.N.; SOUZA, I.C.N.; BRASIL, L.M.B.F.; PIANI, P.P.F. Síndrome de Down: Aspectos citogenéticos, clínicos e epidemiológicos. *Revista Paraense de Medicina*, 26(3):online, 2012.
14. FRANEK, K.J.; BUTLER, J.; JOHNSON, J. SIMENSEN, R.; FRIEZ, M.J.; BARTEL, F.; MOSS, T.; DUPONT, B.; BERRY, K.; BAUMAN, M.; SKINNER,C.; STEVENSON, R.E.; SCHWARTZ, C.E. Deletion of the immunoglobulin domain of IL1RAPL1 results in nonsyndromic X-linked intellectual disability associated with

- behavioral problems and mild dysmorphism. *American Journal of Medical Genetics*, 155A(5):1109-1114, 2011.
15. FREEMAN, S.B.; BEAN, L.H.; ALLEN, E.G.; TINKER, S.W.; LOCKE, A.E.; DRUSCHEL, C.; HOBBS, C.A.; ROMITTI, P.A.; ROYLE, M.H.; TORFS, C.P.; DOOLEY, K.J.; SHERMAN, S.L. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genetics in Medicine*, 10(3):173-180, 2008.
 16. GIJSBERS, A.C.; LEW, J.Y.; BOSCH, C.A.; SCHUURS-HOEIJMAKERS, J.H.; VAN HAERINGEN, A.; DEN HOLLANDEER, N.S.; KANT, S.G.; BIJLSMA, E.K.; BREUNING, M.H.; BAKKER, E.; RUIVENKAMP, C.A. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *European Journal of Human Genetics*, 17(11):1394-1402, 2009.
 17. GRUBENMANN, C.E.; FRANK, C.G.; KJAERGAARD, S.; BERGER, E.G.; AEBI, M.; HENNET, T. ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Human Molecular Genetics*, 11:2331-2339, 2002.
 18. GUITART-FELIUBADALÓ, M.; BRUNET-VEGA, A.; VILLATORO-GÓMEZ S.; BAENA-DÍEZ, N.; GABAU-VILA, E. Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosómicas diagnosticables en el paciente. *Revista de Neurología*, 41(Supl 1):S21-26, 2006.
 19. HAITINA, T.; LINDBLOM, J.; RESTRÖM, T.; FREDRIKSSON, R. 2006. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*. 88(6):779-90, 2006.
 20. HARPER, P.S. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Human Genetics*, 119(1-2):226-232, 2006.
 21. HOWELL, K.B.; KORNBERG, A.J.; HARVEY, A.S.; RYAN, M.M.; MACKAY, M.T.; FREEMAN, J.L.; RODRIGUEZ CASERO, M.V.; COLLINS, K.J.; HAYMAN, M.; MOHAMED, A.; WARE, T.L.; CLARK, D.; BRUNO, D.L.; BURGESS, T.; SLATER, H.; MCGILLIVRAY, G.; LEVENTER, R.J. High resolution chromosomal microarray in undiagnosed neurological disorders. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49(9): 716-724, 2013.
 22. SHAFFER, L.G. & TOMMERUP, N. (Org). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. 6ed. Basel, Karger, 2005, 130 p.
 23. JACKSON L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 45(3):622-639, 2002.
 24. JACOBS, P.A. An Opportune Life: 50 Years in Human Cytogenetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15: 29-46, 2014.
 25. JAEKEN, J.; PROESMANS, W.; EGGERMONT, E.; VAN HOOFF, F.; DEN TANDT, W.; STANDAERT, L.; VAN HERCK, G.; CORBEEL, L. Niemann-Pick type C disease and early cholestasis in three brothers. *Acta Paediatrica Belgica*, 33(1):43-46, 1980.
 26. JAEKEN, J. & CARCHON, H. Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Current Opinion in Pediatrics*, 16(4):434-439, 2004.
 27. KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083):818-821, 1992.
 28. KASHEVAROVA, A.A.; NAZARENKO, L.P.; SCHULTZ-PEDERSEN, S.; SKRYABIN, N.A.; SALYUKOVA, O.A.; CHECHETKINA, N.N.; TOLMACHEVA, E.N.; RUDKO, A.A.; MAGINI, P.; GRAZIANO, C.; ROMEO, G.; JOSS, S.; TÜMER,

- Z.; LEBEDEV, I.N. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. *Molecular Cytogenetics*, 7(1):97-107, 2014.
29. KOLEVZON, A.; ANGARITA, B.; BUSH, L.; WANG, A.T.; FRANK, Y.; YANG, A.; RAPAPORT, R.; SALAND, J.; SRIVASTAVA, S.; FARRELL, C.; EDELMANN, L.J.; BUXBAUM, J.D. Phelan-McDermid syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 6(1):39-50, 2014.
 30. KOUTSOS, A.; MANAIA, A.; WILLINGALE-THEUNE, J. Fishing for genes: DNA microarrays in the classroom. *Science in School*, 12:44-49, 2009.
 31. LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 11(248):1721-1722, 1959.
 32. LUTHARDT, F.W. & KEITGES, E. Chromosomal syndromes and genetic disease. *Encyclopedia of Life Science*, 24-25, 2001.
 33. Maluf, S.W. & Riegel, M. et al. *Citogenética Humana*, 2ed, Artmed, Porto Alegre, 2011, 334 p.
 34. MANNING, M. & HUDGINS, L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities *Genetics in Medicine*, 12(11):742-745, 2010.
 35. MATSON, J.L. & SHOEMAKER, M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities*, 30(6):1107–1114, 2009.
 36. MCLYSAGHT, A.; MAKINO, T.; GRAYTON, H.M.; TROPEANO, M.; MITCHELL, K.J.; VASSOS, E.; COLLIER, D.A. Ohnologs are overrepresented in pathogenic copy number mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1):361-366, 2013. 2013.
 37. MILLER, D.T.; ADAM, M.P.; ARADHYA, S. et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 86:749-764, 2010.
 38. MOREIRA, L.M.A. & GUSMÃO, F.A.G. Aspectos genéticos e sociais da sexualidade em pessoas com síndrome de Down. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 24(2):94-99, 2002.
 39. MOREIRA, L.M.A.; EL-HANIB, C.N.; GUSMÃO, F.A.G. A síndrome de Down e sua patogênese: considerações sobre o determinismo genético. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 22(2):96-99, 2000.
 40. MORRIS, K.J. & ALBERMAN, E. Trends in Down's syndrome live births and antenatal diagnoses in England and Wales from 1989 to 2008: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *British Medical Journals*, 339:b3794, 2009.
 41. NERI, G. & OPITZ, J.M. Down syndrome: comments and reflections on the 50th anniversary of Lejeune's discovery. *American Journal of Medical Genetics*, 149A(12):2647-2654, 2009.
 42. PAVARINO-BERTELLI, E.C.; BISELLI, J.M.; RUIZ, M.T.; Goloni-Bertollo, E.M. Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em síndrome de Down. *Revista Brasileira de Medicina*, (62):401-408, 2005.
 43. PAWELETZ, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1):72-75, 2001.
 44. PEREIRA, R.R.; PINTO, I.P.; MINASI, L.B.; DE MELO, A.V.; CUNHA, D.M.C.; CRUZ, A.S.; RIBEIRO, C.L.; DA SILVA, C.C.; SILVA, D.mM.; DA CRUZ, A.D.

- Screening for intellectual disability using high-resolution CMA technology in a retrospective cohort from Central Brazil. *PLoS One*, 9(7):e103117, 2014.
45. PHELAN, M.C.; ROGERS, R.C.; SAUL, R.A.; STAPLETON, G.A.; SWEET, K.; MCDERMID, H.; SHAW, S.R.; CLAYTOR, J.; WILLIS, J.; KELLY, D.P. 22q13 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 101(2):91-99, 2001.
 46. PINTO, I.P. A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual. 10/02/2015. 64 p. Dissertação de Mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia 10/02//2015, Mestrado em Genética, 2015.
 47. PITON, A.; MICHAUD, J.L.; PENG, H.; ARADHYA, S.; GAUTHIER, J.; MOTTRON, L.; CHAMPAGNE, N.; LAFRENIÈRE, R.G.; HAMDAN, F.F.; S2D TEAM; JOOBER, R.; FOMBONNE, E.; MARINEAU, C.; COSSETTE, P.; DUBÉ, M.P.; HAGHIGHI, P.; DRAPEAU, P.; BARKER, P.A.; CARBONETTO, S.; ROULEAU, G.A. Mutations in the calcium-related gene *IL1RAPL1* are associated with autism. *Human Molecular Genetics*, 17(24):3965-3974, 2008.
 48. PRASAD, C.; PRASAD, A.N.; CHODIRKER, B.N.; LEE, C.; DAWSON, A.K.; JOCELYN, L.J.; CHUDLEY, A.E. Genetic evaluation of pervasive developmental disorders: the terminal 22q13 deletion syndrome may represent a recognizable phenotype. *Clinical Genetics*, 57(2):103-109, 2000.
 49. PROBST, F.J.; ROEDER, E.R.; ENCISO, V.B.; OU, Z.; COOPER, M.L.; ENG, P.; LI, J. GU, Y.; STRATTON, R.F.; CHINAULT, A.C.; SHAW, C.A.; SUTTON, V.R.; CHEUNG, S.W.; NELSON, D.L. Chromosomal microarray analysis CMA detects a large X chromosome deletion including *FMR1*, *FMR2*, and *IDS* in a female patient with mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*, 143A(1):1358-1365, 2007.
 50. RIBEIRO, M.F.M.; BARBOSA, M.A.; PORTO, C.C. Paralisia cerebral e síndrome de Down: nível de conhecimento e informação dos pais. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(4):2099-2106, 2011.
 51. SCHRÖCK E, VELDMAN T, PADILLA-NASH H et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet*. 1997;1013:255-62.
 52. SHAO, H.; BURRAGE, L.C.; SINASAC, D.S.; HILL, A.E.; ERNEST, S.R.; O'BRIEN, W.; COURTLAND, H.W.; JEPSEN, K.J.; KIRBY, A.; KULBOKAS, E.J.; DALY, M.J.; BROMAN, K.W.; LANDER, E.S.; NADEAU, J.H. Genetic architecture of complex traits: large phenotypic effects and pervasive epistasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50):19910-19914, 2008.
 53. SHENG, M. AND KIM, E. The Shank family of scaffold proteins. *Journal of Cell Science*, 113(Pt11):1851-1856, 2000.
 54. STORNILOLO, L.M.A.; GIMENES, P.V.S.; Costa, A.R.; Melo, D.G. Aconselhamento genético de famílias de pacientes com deficiência intelectual da APAE de São Carlos, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Coletiva*, 19(3):375-83, 2011.
 55. VERMA, R.S. & BABU, A. *Human Chromosomes: Principles & Techniques*, 2ed, Ram McGraw-Hill Inc., New York, 1995, 419 p.
 56. WIEGANT, J.; VAN HALL, T.; VAN DER BURG, M.; COLOMBO, M.; TANKE, H.J.; OFFRINGA, R.; ROSENBERG, C. Application of multicolor fluorescence in situ hybridization analysis for detection of cross-contamination and in vitro progression in commonly used murine tumor cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 139(2):126-132, 2002.

57. WISEMAN F.K.; ALFORD, K.A.; TYBULEWICZ, V.L.; FISHER, E.M. Down syndrome – recent progress and future prospects. *Human Molecular Genetics*, 18(R1):R75-83, 2009.
58. COROMINAS, R.; YANG, X.; LIN, G.N.; KANG, S.; SHEN, Y.; GHAMSARI, L.; BROLY, M.; RODRIGUEZ, M.; TAM, S.; TRIGG, S.A.; FAN, C.; YI, S.; TASAN, M.; LEMMENS, I.; KUANG, X.; ZHAO, N.; MALHOTRA, D.; MICHAELSON, J.J.; VACIC, V.; CALDERWOOD, M.A.; ROTH, F.P.; TAVERNIER, J.; HORVATH, S.; SALEHI-ASHTIANI, K.; KORKIN, D.; SEBAT, J.; HILL, D.E.; HAO, T.; VIDAL, M.; IAKOUCHEVA, L.M. Protein interaction network of alternatively spliced isoforms from brain links genetic risk factors for autism. *Nature Communications*, 5:3650, 2014.
59. ZAHIR, F. & FRIEDMAN, J.M. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clinical Genetics*, 72(4):271-287, 2007.
60. ZILINA, O.; TEEK, R.; TAMMUR, P.; KUUSE, K.; YAKOREVA, M.; VAIDLA, E.; MÖLTER-VÄÄR, T.; REIMAND, T.; KURG, A.; OUNAP, K. Chromosomal microarray analysis as a first-tier clinical diagnostic test: Estonian experience. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2(2):166-175, 2014.
61. ZIPURSKY, A.; PEETERS, M.; POON, A. Megakaryoblastic leukemia and Down's syndrome – A review. *Progress in Clinical and Biological Research*, 246:33-56, 1987.
62. ZLOT R. Anomalias congênitas em natimortos e Neomortos: o papel do aconselhamento Genético. Março/2008. 111 p. Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro março/2008, Mestrado em Ciências, 2008.

10. APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Dados da Identificação

Título do Projeto: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico

Pesquisador Responsável: Dr. Aparecido Divino da Cruz

Nome (sujeito da pesquisa): _____,

RG nº _____, Naturalidade _____, Idade _____, Endereço _____, Neste ato representado por mim:

Nome dos representantes legais:

Pai _____ Naturalidade _____, Idade _____, Estado Civil _____, Profissão _____, Endereço _____
Mãe _____ Naturalidade _____, Idade _____, Estado Civil _____, Profissão _____, Endereço _____

Está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico cujos objetivos e justificativas são: propor a investigação genética do paciente com indicação clínica de retardo mental, visto que o diagnóstico de um paciente com essa síndrome estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e portadores, e de realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos, possibilitando assim, um tratamento específico, diminuindo o impacto econômico, social e pessoal que esta síndrome acarreta.

Os critérios de inclusão são: pacientes encaminhados ao Núcleo de Pesquisas Replicon e LaGene com indicação clínica de retardo mental, acompanhados dos pais biológicos que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão são: indivíduos maiores de 18 anos, com indicação clínica de retardo mental, que não concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, ou menores, cujos pais biológicos não aceitarem a participação do(a) filho(a) neste estudo, ou que não assinarem o TCLE, ou ainda, pacientes que apresentarem outras doenças genéticas já diagnosticadas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a doação voluntária de uma amostra de sangue de meu(minha) filho(a) biológico(a) para colaborar com o diagnóstico

do retardo mental, juntamente com uma amostra, doada voluntariamente, de meu sangue para comparação com a finalidade de determinar causas genéticas e sua hereditariedade.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a confirmação da causa do retardo mental (quando tiver uma etiologia genética). Estou ciente ainda, que a técnica proposta já foi realizada em outros estudos e é reprodutiva, evitando assim possíveis riscos.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta do sangue, você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha. Podem, também, ocorrer a formação de hematomas que não são comuns, e caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado(a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Estou ciente de que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado, ou elemento, que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

O pesquisador responsável, envolvido com o referido projeto é: Aparecido Divino da Cruz, e com ele poderei manter contato pelos telefones: (62)3946-1443/3946-1086.

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Tenho sido orientado ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, autorizo a participação de (nome do sujeito da pesquisa) _____ na referida pesquisa, e manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou pagar.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, ____ de _____ de 201__.

(nome e assinatura do Pai)

(nome e assinatura da Mãe)

Pesquisador Dr. Aparecido Divino da Cruz