



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

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO NA IN-
VESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS ESTRUTURAIS
NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA - TEA**

Goiânia
© 2017

GUSTAVO RIOS NASCIMENTO

ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO NA INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS ESTRUTURAIS NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA - TEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética - MGene, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof (a). Dra. Lysa Bernardes Minasi

Co-Orientador: Prof. Aparecido Divino da Cruz

Goiânia
©2016

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

N244a Nascimento, Gustavo Rios
Análise cromossômica por microarranjo na investigação
de alterações genômicas estruturais no Transtorno do Espec-
tro
Autista - TEA[manuscrito]/ Gustavo Rios Nascimento. --
2017.
77 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica
de
Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética,
Goiânia, 2017
Inclui referências f.59-71

1. Autismo - Genética. 2. Cromossomos - Análise. I.Minasi, Lysa
Bernardes. II.Cruz, Aparecido Divino da. III. Pontifícia Uni-
versidade
Católica de Goiás. IV. Título.

CDU: 575(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PROFESSORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1000 • Setor Universitário
Cidade: Fátima - GO • CEP: 74060-000
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 2408.1070 • Fax: (62) 2408.1070
www.pucgoias.edu.br • pucgoias@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 133/2017

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: GUSTAVO RIOS NASCIMENTO

DEFENDIDA EM 07 DE MARÇO DE 2017 E Aprovada COM CONCEITO A

O título foi alterado (☒ não () sim)

BANCA EXAMINADORA

Lysa Bernardes Minasi

Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi

PUC Goiás (Presidente)

Claudio Carlos da Silva

Prof. Dr. Claudio Carlos da Silva

PUC Goiás

Marc Alexandre Duarte Gigonzac

Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonzac

Membro externo(UFG)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha esposa Melaine Stefane Barbosa, minha filha Mariana Barbosa Nascimento, aos meus pais e irmã, Fernando Pereira do Nascimento, Eliana Alves Rios, Fernanda Rios Nascimento e a todos meus familiares em nome do meu avô Eulávio Ferreira do Nascimento (*In memoriam*).

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar por conceder tantas graças e maravilhas que me permitem chegar hoje ao fim de mais essa etapa. Dentre tantas, uma é poder agradecer a cada um destes queridos (as) que estão e estiveram comigo nessa etapa tão especial.

A minha amada esposa Melaine Stefane Barbosa por aguentar passar duas vezes por tudo isso comigo. Obrigado pelo seu amor, paciência, broncas e por me deixar explicar o que entendo e não entendo da encantadora genética.

Aos meus queridos pais Fernando Pereira do Nascimento e Eliana Alves Rios e minha irmã Fernanda Rios Nascimento, por serem meus primeiros, melhores e fundamentais professores. Me fizeram chegar aqui sabendo passar por dificuldades quando, inevitavelmente, me deparasse com elas e tendo certeza de que o melhor sempre está por vir, porque “Não dou conta” não existe!

Com a frase do meu querido avô Eulávio Ferreira do Nascimento (*in memoriam*), dita em uma de nossas tantas conversas, que eram aulas de sabedoria e de motivação para mim, agradeço todos meus familiares de todo coração: “Carro de boi pesado é que canta bonito”.

Esse trabalho não existiria se não fosse pelos meus professores da graduação. Destaco alguns os quais me incentivaram muito e me motivaram para o mestrado que hoje concluo. Com certeza foram fundamentais em tudo isso. Muito obrigado ao professor Wilson de Melo Cruvinel, Luiz Murilo Martins de Araújo e Paulo Luiz Carvalho Francescantônio. Tenho certeza que sem vocês eu não estaria concluindo essa etapa.

Aos que me empurraram, conduziram e caminharam comigo nesse trabalho: a minha orientadora Dra. Lysa Bernardes Minasi o qual tive o privilégio de ser seu primeiro aluno de mestrado, muito obrigado pela paciência, orientação concreta, verdadeira e atenciosa e pela amizade.

Ao professor, amigo e meu co-orientador que tem todo meu respeito admiração e que me acolheu de verdade no meu retorno a essa instituição para realização desse trabalho, professor Aparecido Divino da Cruz (Peixoto).

Ao professor Cláudio Carlos da Silva, por sua amizade, apoio, atenção e bom humor sempre presentes.

A todos professores e funcionários do Programa De Mestrado Em Genética Da Pontifícia Universidade Católica De Goiás.

A Irene Plaza Pinto pela parceria de sempre, por me socorrer em meio a correria de seus afazeres achando um tempinho para me ensinar e auxiliar na realização e interpretação do CMA.

Ao Marc Alexandre Gigonzac por me ajudar nas tantas dúvidas sobre esse projeto e por realizar a técnica de Amplidex para X-frágil.

A Damiana Mírian da Cruz e Cunha e Cristiano Luiz Ribeiro pela generosa contribuição com o bandeamento G e análise das metáfases.

Agradeço aos meus colegas, hoje amigos, que sempre me ajudaram em tudo, não fiz nada sozinho, vocês tornaram tudo, possível, mais fácil e divertido.

Aos pacientes e suas famílias por confiarem suas amostras para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que fizeram desse trabalho um trabalho diferente...diferente porque o peso que carrego comigo são só de boas lembranças!

Sumário

1.	RESUMO	IX
2.	ABSTRACT	X
3.	INTRODUÇÃO.....	11
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1	Histórico e Conceito.....	13
4.2	Aspectos Epidemiológicos	14
4.3	TEA: Sintomas, Diagnóstico e Associação com Outras Doenças.....	15
4.4	ABORDAGEM GENÔMICA PARA TEA	19
4.4.1	Genes Candidatos.....	25
5.	OBJETIVO	28
5.1	Objetivo Geral	28
5.2	Objetivos Específicos.....	28
6.	MATERIAL E MÉTODOS	29
6.1	Seleção dos Participantes	29
6.1.1	Critérios de Inclusão.....	31
6.1.2	Critérios de Exclusão.....	31
6.2	Aplicação dos Questionários CARS e ADI-R.....	31
6.3	Coleta e Processamento das Amostras	33
6.3.1	Cariótipo com Bandas G	33
6.3.2	Extração e Quantificação das Amostras de DNA.....	33
6.3.3	Pesquisa para X-frágil por Detecção de Repetições CGG no Gene FMR1.....	33
6.3.4	Análise Cromossômica por Microarray.....	33
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
8.	OBSERVAÇÕES GERAIS.....	54
9.	CONCLUSÃO.....	58
10.	BIBLIOGRAFIA	59
11.	APÊNDICE	72

1. RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é definido por atraso da capacidade de interação social, de desenvolvimento da fala e do uso da imaginação. Estas características são observadas principalmente a partir 3 anos de idade, resultando no comprometimento do desenvolvimento em relação a expectativa esperada para idade. Embora ainda não se tenha estabelecido as causas do TEA e as justificativas para influências de fatores externos, a melhor evidência sugere que o comportamento regressivo seja determinado geneticamente. Este trabalho tem como objetivo investigar CNVs (do inglês, *Copy Number Variation* – Variação do Número de Cópias) de ganho e de perda, pela técnica CMA (do inglês, *Chromosomal Microarray Analysis* – Análise Cromossômica em Microarranjos), em pacientes com indicação clínica para TEA. Com finalidade de triar a suspeita clínica, 8 indivíduos foram submetidos a entrevista (CARS do inglês, *Childhood Autism Rating Scale* – Escala de Classificação de Autismo na infância/ADIR do inglês, *Autism Diagnostic Interview, Revised* – Entrevista de Diagnóstico de Autismo Revisado). Em seguida, foram submetidos a testes genéticos: Cariótipo com bandeamento G, pesquisa de X-frágil por Amplidex modificado e CMA. Os resultados revelaram que de 8 indivíduos entrevistados via CARS, 6 apresentaram valores de score elevados. Quanto ao ADIR, 7 indivíduos apresentaram comprometimento em pelo menos 3 das 4 áreas do comportamento avaliadas. Em relação aos testes genéticos que antecederam ao CMA, apenas 2 indivíduos apresentaram alterações e ambos no teste de triagem para X-frágil. Nos seis indivíduos avaliados para CMA observamos predomínio de CNVs envolvendo os cromossomos X, 14, 15 e 22. Dentre todas as CNVs observadas neste estudo observamos predomínio de CNVs de ganhos em relação às CNVs de perdas e os genes que se destacaram foram: *ST6GAL2*, *NUP155*, *WDR70*, *CHRNA7*, *TPPP*, *ZNF630*, *SSX6* e *SPACA5*. Com isso, concluímos que existe diversidade de genes e de CNVs relacionados a indivíduos com TEA e que apesar de não haver um padrão gênico estabelecido é possível encontrar regiões gênicas que se repetem favorecendo o fenótipo.

Palavras Chaves: CMA; Autismo; CNVs; Microduplicação; Microdeleção.

2. ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by social impairments, speech delay, and disruption of developmental imagination. These characteristics are observed mainly at 3 years of age, resulting in developmental impairment in relation to the expected expectation for age. Although the causes of ASD and the justifications for influences of external and environmental factors have not yet been established, the best evidence suggests that regressive behavior is genetically determined. The aim of this study was investigate CNVs (gain and loss), by CMA technique (Chromosomal Microarray Analysis), in patients with clinical indication for ASD. In order to screen the clinical suspicion, 8 subjects were interviewed (CARS, Autism Diagnostic Interview, Revised - Interview Of Diagnosis of Autism Revised). Then, they were submitted to genetic tests: G-banding karyotype, fragile X research with Amplidex Kit and CMA. The results revealed that of 8 individuals interviewed via CARS, 6 presented high score values. Regarding ADIR, 7 subjects presented comprehension in at least 3 of the 4 areas of behavior evaluated. The screening test for X-fragile revealed only 2 individuals with alterations so the CMA was done for six individuals. The CMA approach showed a predominance of CNVs in chromosomes X, 14, 15, and 22. Among all CNVs observed in this study, we observed a predominance of CNVs of gains in relation to CNVs of losses and the genes that stood out were *ST6GAL2*, *NUP155*, *WDR70*, *CHRNA7*, *TPPP*, *ZNF630*, *SSX6*, and *SPACA5*. With this, we observed that there is a diversity of genes and CNVs related to individuals with ASD and that although there is no established gene pattern it is possible to find gene regions that repeat themselves favoring the phenotype.

Key Words: CMA; Autism; CNVs; Microduplication; Microdeletion.

3. INTRODUÇÃO

O autismo foi relatado pela primeira vez em 1943 por Leo Kanner, um professor de psiquiatria infantil, austríaco-americano. Ele descreveu crianças com deficiência intelectual e isolamento social severo, não explicado pelo nível de desenvolvimento das crianças. Kanner se referiu ao que observou como síndrome de autismo infantil, com base no critério de Bleizers para esquizofrenia, descrevendo a perda de interesse social. Ao mesmo tempo, o professor Hans Asperger, em Viena, na Áustria, observou pacientes semelhantes com psicopatia autista e habilidades intelectuais normais. Hans Asperger, observou que os pais dessas crianças também pareciam distantes e socialmente isolados. Ambos, Kanner e Asperger, suspeitaram de uma origem biológica ou mesmo genética da doença. No entanto, esse conhecimento foi esquecido durante a década de 1950-1960, até que Michael Rutter e Lorna Wing retomaram a discussão sobre conceitos diagnósticos, diagnóstico diferencial e etiologia do TEA (transtorno do espectro autista) na década de 1970 e 1980 (Freitag, 2007).

Atualmente o TEA é definido como um grupo de doenças caracterizadas por distúrbios relacionadas a interação e comunicação social, com padrões restritos e estereotipados relacionados ao comportamento, interesses e realização de atividades em geral (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª Edição - DSM-IV, 2002).

Compreender a "genética" do autismo provou ser mais complexo do que o previsto no início da década de 1990, quando se supôs que essa questão seria resolvida ao analisar DNA de aproximadamente 300 famílias de autistas e realizar estudos de associação baseados em polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no genoma de crianças com predisposição genética a desenvolver essa doença. Entretanto, os principais estudos de associação de genes candidatos, usados para testar variantes comuns que contribuem para o TEA, não identificaram áreas de interesse genômico consistentes. Mas com a recente disponibilidade de grandes bancos de dados de DNA, estudos de associações genômicas estão começando a apresentar resultados mais consistentes (Wang et al, 2009).

Existem muitos relatos de autismo ou TEA relacionados a anomalias cromossômicas (Lauritsen et al, 1999). Na maioria dos casos, dados epidemiológicos são escassos. Mas, apesar da escassez destes dados é possível estimar que anormalidades cromossômicas visíveis citogeneticamente são identificáveis em 5% dos casos, varia-

ções de número de cópias (CNVs), isto é, deleções e duplicações submicroscópicas são identificáveis em 10-20% dos casos e distúrbios em um único gene são identificáveis em 5% dos casos (Judith et al, 2011). Estas alterações têm sido observadas em diversas regiões cromossômicas, envolvendo os cromossomos na quase totalidade. Objetivo dos pesquisadores atualmente têm sido encontrar genes candidatos ou regiões de genes candidatos, para uma análise detalhada destas anormalidades (Vorstman et al, 2006).

As CNVs são alterações cromossômicas estruturais, que resultam em ganhos ou perdas de certos loci genômicos e que podem ser encontradas em todo genoma humano (Sebat et al, 2004). Embora a maioria das CNVs não tenham consequências fenotípicas aparentes, há evidências que várias microdeleções ou microduplicações cromossômicas em locais específicos, estejam envolvidas na predisposição a várias doenças, bem como, na suscetibilidade ao TEA (Stankiewicz & Lupski, 2010). Avanços tecnológicos, no que se refere a metodologias genéticas de alta resolução, facilitaram a detecção destas CNVs em estudos genéticos em larga escala. Além disso, a queda contínua do tempo de trabalho e dos custos associados a essas tecnologias, promovem sua inclusão na triagem para testes pré e pós-natal (Idan et al, 2013).

Uma das ferramentas que se destacam na avaliação de CNV's é a matriz de hibridização genômica comparativa (aCGH), também chamado de microarranjos cromossômicos (CMA). Alguns estudos sugerem que o rastreamento de CNVs por microarranjos cromossômicos (CMA) deva substituir as técnicas citogenéticas convencionais sendo indicado como primeiro teste a ser realizado em indivíduos TEA e deficiência intelectual (Miller et al, 2010). Contudo, a frequência relativamente baixa e a distribuição genômica generalizada destas CNVs nos casos de TEA dificultam a utilização clínica do CMA como uma potencial ferramenta de diagnóstico. E apesar do papel importante das CNVs em casos de TEA e o uso crescente da triagem por CMA para a avaliação genética destes indivíduos, há uma necessidade de consolidar a grande quantidade de dados de CNVs que são gerados a partir de indivíduos com TEA e posteriormente priorizar os loci mais consistentes associados à suscetibilidade a doença (Idan et al, 2013).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Histórico e Conceito

Atualmente já se sabe que os sinais e sintomas do autismo se manifestam de forma discreta e podem ser observados ainda na infância, o que dificulta o diagnóstico. No entanto, é possível identificar se um indivíduo é autista com no mínimo 18 a 24 meses de idade, sendo fundamental a identificação logo no início dos primeiros sinais devido a notável melhora no prognóstico. Para a maioria das crianças, os sintomas aparecem de forma gradual sendo que somente 30% se manifesta de forma evidente logo de início (Guthrie et al, 2012).

Em muitos casos, o desenvolvimento da fala se encontra comprometido. As crianças começam a falar e, em seguida, gradualmente ou abruptamente, perdem a capacidade de se comunicar através da fala ou em alguns casos nem chegam a iniciar a comunicação verbal e tornam-se distantes. Em questão de dias, a criança pode recusar-se a fazer contato visual e parar de responder quando chamada pelo nome. Podem também desenvolver movimentos repetitivos de forma imediata ou tardia, estabelecendo um padrão de regressão da fala aproximadamente aos 3 ou 4 anos de idade. Embora ainda não se tenha estabelecido as causas do autismo e as justificativas para influências de fatores ambientais, como exposições exógenas de forma geral, a melhor evidência, incluindo a análise retrospectiva da criança e estudos neuropatológicos, sugere que o comportamento regressivo seja determinado geneticamente (Ozonoff et al, 2010).

Quanto aos critérios de diagnóstico para TEA destaca-se o atraso ou anormal capacidade de interação social, de desenvolvimento da fala e do uso da imaginação. Estas características são observadas principalmente aos 3 anos de idade, resultando no comprometimento do desenvolvimento em relação a expectativa esperada para idade. A evolução do autismo definida aproximadamente aos 24 meses de idade, tende a se tornar estável por vários anos. Embora os primeiros sinais estejam relacionados a alterações referentes a comunicação, em alguns casos outros sinais podem se manifestar primeiro, dentre eles: irritabilidade, falta ou excesso de responsividade, mudança brusca no nível de atividade e atraso no desenvolvimento motor (Klin, 2006). Estudos realizados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), mostrou que 50% dos pais de crianças com TEA observaram atrasos no desenvolvimento aos 12 meses de idade e 80% observaram atraso no desenvolvimento da fala aos 36 meses de idade (CDC, 2006).

No entanto, existe um grupo de doenças que se manifestam de forma semelhante a estas do autismo e de acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV), estão

agrupados na categoria de transtornos invasivos do desenvolvimento (PDDs) sendo: o transtorno autista, o transtorno de Asperger, o transtorno invasivo do desenvolvimento sem especificação (PDD-NOS) e o transtorno desintegrativo da infância (CDD, síndrome de Heller). Este grupo de doenças é caracterizado por um espectro comum de alterações na interação social, associada a diferentes estágios de atraso na comunicação, também apresentando comportamentos repetitivos e de interesses restritos. Atualmente todos estes transtornos invasivos do desenvolvimento (PDDs) são denominados transtornos do espectro autista (TEA) (Brentani et al, 2013).

4.2 Aspectos Epidemiológicos

O estudo epidemiológico pioneiro sobre o autismo foi realizado por Victor Lotter em 1960 na Inglaterra. Estudos posteriores foram realizados na década de 1990 e estimaram que a prevalência de autismo estava entre 10 e 16 para cada 10000 indivíduos, enquanto casos de indivíduos com PDDs na década de 2000 foi de 60 para cada 10000, o que representa um aumento de quase 10 vezes em relação aos dados anteriores (Fombonne, 2009; 2006). Levantamento epidemiológico em todo mundo revelou casos de autismo em todas regiões e com dados de prevalência semelhantes (Elsabbagh et al, 2012). Indivíduos com alterações comportamentais não específicas são mais comuns, com prevalência de 3/1000, seguido por autismo com 2/1000 e de forma mais rara está a síndrome de Asperger com 6/10000 (Fombonne, 2009). Estudo realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estimou prevalência de 1% em algumas regiões dos Estados Unidos (CDC, 2006).

Poucos estudos epidemiológicos sobre autismo foram realizados nos países da América Latina (Elsabbagh et al, 2012). No Brasil um estudo piloto foi realizado no estado de São Paulo. O estudo inclui 1470 crianças com faixa etária de 7 a 12 anos que foram triadas seguindo padrões e critérios pré-estabelecidos pela Associação Americana de Psiquiatria. A prevalência encontrada foi de 0,3 % e uma justificativa para baixa frequência foi o tamanho da amostra (Paula et al, 2011).

Os dados epidemiológicos, indicam que o aumento aparente de autismo não reflete um verdadeiro aumento na incidência de TEA, mas uma maior e mais apurada capacidade de investigação tanto pela população em geral, que se familiarizou com as características indicativas da doença, bem como os profissionais, que possuem melhores ferramentas de

diagnóstico e acesso a novas informações a respeito do TEA (Fombonne et al, 2006; Taylor, 2006; Atladottir et al, 2007).

4.3 TEA: Sintomas, Diagnóstico e Associação com Outras Doenças

Alguns critérios foram estabelecidos para complementar o diagnóstico ou a indicação clínica de TEA. Os testes que melhor avaliam estes critérios e, portanto, melhor identificam o TEA são: Programa de Diagnóstico de Observação do Autismo (do inglês, *Autism Diagnostic Observation Schedule* – ADOS) e a Entrevista de Diagnóstico de Autismo, Revisado (do inglês, *Autism Diagnostic Interview, Revised* - ADI-R). Estes testes apresentam extensa e completa avaliação do desenvolvimento e comportamento, além da confiabilidade quando aplicado por profissional devidamente capacitado. O *Autism Diagnostic Interview* (ADI) foi criado para ser aplicado em crianças maiores de 5 anos de idade ou idade mental mínima de 2 anos, com base nos critérios propostos pela Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV) e pelo CID-10 (Código Internacional de Doenças - 10). Posteriormente o ADI foi revisado e modificado para avaliar crianças com idade mental de 18 meses até idade adulta, sendo então denominado ADI-R (Brentani et al, 2013).

Dentre as características clínicas presentes em indivíduos com autismo, foi observado que aproximadamente 60-70% apresentam algum nível de deficiência intelectual, incluindo indivíduos com transtorno de Asperger e PDD-NOS (Levy et al, 2011). Estes com QI dentro da faixa de normalidade, quando submetidos a testes neuropsicológicos, apresentaram disfunção cognitiva, particularmente em funções de execução de atividades motoras e cognição social, tais como atenção, planejamento e controle de inibição (Sun, 2012). Por outro lado, cerca de 10% dos indivíduos com TEA possuem habilidades notáveis para a sua idade, muitas vezes apresentando habilidades altamente especializadas e não influenciadas pelo seu funcionamento global prejudicado (Klin, 2006).

Aproximadamente 20-30% dos indivíduos com TEA são não-verbais e entre 20 e 25% apresentam regressão acentuada em relação a linguagem anteriormente desenvolvida (Lord et al, 2004). Algumas habilidades pré-verbais, tais como: atenção, resposta ao discurso, gestos, imitação e comunicação simbólica, são considerados elementos fundamentais para o início da avaliação da comunicação verbal (Paul et al, 2007 & 2008). Identificar deficiências nestas habilidades é importante para a intervenção, já que este nível de comunicação é fundamental para a aquisição da linguagem verbal. Importante ressaltar que apesar de ser observado

comprometimento da fala em crianças com TEA, foram observados também casos de reversão deste quadro, bem como do desenvolvimento tardio (Pickett et al 2009).

Quando as crianças com TEA começam a desenvolver a fala, algumas características incomuns são observadas, como ecolalia. A ecolalia é a repetição de um discurso ou palavra de forma imediata ou tardia, sendo ainda parcial ou total. A ecolalia foi inicialmente caracterizada como um comportamento indesejável, no entanto, o indivíduo com TEA utiliza desta repetição como uma estratégia para se comunicar e em alguns casos a ecolalia tende a desaparecer (Tager-Flusberg et al, 2005).

Outra alteração de linguagem comum nestes indivíduos é a inversão do uso do pronome e parece estar relacionada com a natureza dêitica (elemento que tem por objetivo localizar o fato no tempo e espaço sem defini-lo, Ex: lá, aqui), dos pronomes. Em muitos casos em que o autista consegue articular palavras e formular frases gramaticalmente corretas, seu discurso reflete falhas fundamentais de compreensão e expressão de atitudes e intenções (Paul et al, 2011). Estas limitações na fala são observadas também de forma distintas nos diferentes tipos de transtornos aos quais engloba o TEA. Em crianças com autismo clássico é observado maior dificuldade na estrutura linguística, mas também é notável dificuldade quanto ao uso social da linguagem. Já os indivíduos com síndrome de Asperger nota-se menos problemas com estrutura linguística, mas dificuldade evidente quanto ao uso social eficaz da linguagem. Enquanto que crianças com transtorno semântico pragmático, apresentam dificuldade em compreender as estruturas linguísticas de forma geral (Hage & Guerreiro, 2009).

Aproximadamente 25% das crianças com 2 ou 3 anos de idade que se enquadram nos critérios de diagnóstico de TEA, começam a falar e se comunicar de fato aos 6 ou 7 anos e com isso se estabelecem nos mais diferentes níveis de escolaridade, passando a frequentar a escola. Porém, mesmo assim, prejuízos sociais geralmente continuam. Quanto aos outros 75%, a maioria tem alguma melhora com a idade, mas continuam a exigir essencialmente a atenção dos pais e apoio social (Judith, 2011).

Alguns estudos indicam que menos de 5% das crianças com autismo e dificuldade de comunicação grave conseguem se recuperar suficientemente para uma vida independente. No entanto, a tolerância demasiada atualmente aplicada aos critérios de diagnóstico, parece ser uma tendência e, portanto, possivelmente responsável pelo aumento do número de casos de recuperação completa. Estudos retrospectivos de acompanhamento durante 20 anos em pacientes adultos com TEA na faixa etária de 22 a 46 anos, revelaram que metade destes

indivíduos estavam empregados e em alguns casos, trabalhando período integral, mas apenas 12% viviam de forma independente, sendo que 56% ainda viviam com os pais (Farley et al, 2009).

Outras características clínicas presentes em frequência variável também podem ser observadas no indivíduo com TEA. A epilepsia apresenta forte associação com autismo, relatada em até um terço dos indivíduos adultos com TEA. Pode se apresentar de forma subclínica, com alterações no eletroencefalograma, mas sem convulsões, e é particularmente frequente no transtorno desintegrativo (Estecio et al, 2002).

Como o autismo, a epilepsia é um distúrbio do cérebro com múltiplas causas genéticas e não genéticas e uma gama de fenótipos, sendo os espasmos infantis possivelmente relacionados a sintomas de autismo resultando em não desenvolvimento da linguagem e deficiência intelectual, especialmente quando a atividade epileptiforme envolve ambos os lobos temporais. Como foi observado em uma criança não-verbal com deficiência intelectual, autismo e epilepsia que apresentou esclerose hipocampal bilateral precoce (Asano et al, 2001).

Os sintomas comportamentais do autismo são frequentes também em outras doenças como na esclerose tuberosa complexa (TSC) e na síndrome do X frágil (SXF), mas estes dois distúrbios, no entanto, representam apenas uma minoria do total de casos de autismo (Dykens & Volkmar, 1997). Dada a alta taxa de epilepsia em crianças com TSC e a associação entre o autismo e epilepsia, não surpreende que 25% dos pacientes com TSC apresentem autismo (Baker et al, 1998). Na população de pacientes com autismo, numerosos estudos têm citado taxas de TSC de 1,1% a 1,3%, embora baixa, são 30% mais elevadas do que a prevalência de TSC na população em geral (Chakrabarti & Fombonne, 2001).

SXF é uma doença genética ligada ao cromossomo X que está significativamente associada com o autismo e apresenta características faciais incomuns, macro-orquidismo na idade adulta, e de gravidade cognitiva variável. Ela é causada por um aumento do número de trinucleótido (CGG) que se repetem na região promotora do gene FMR1 levando a deficiência intelectual denominada X-frágil. Aproximadamente 30% dos indivíduos com SXF apresentam espectro autista, entretanto, há discordância, sobre o grau de prevalência SXF em pacientes com autismo (Rogers et al, 2001). Estudos epidemiológicos encontraram taxas de SXF entre 7% e 8% em populações com autismo (Estecio et al, 2002). As discrepâncias em relação à prevalência de SXF entre os indivíduos com autismo podem refletir a limitada confiabilidade dos testes citogenéticos utilizados no passado em comparação com os testes moleculares mais sensíveis atualmente utilizados (Rutter, 2000).

A neurofibromatose do tipo I, uma doença autossômica dominante com manifestações neurológicas e cutâneas, a síndrome de Angelman (AS) e síndrome de Prader-Willi (PWS) que geralmente resultam de deleções genéticas ou dissomia uniparental em 15q11-q13, também podem estar associadas ao autismo em frequência menor que TSC e SXF (Sutcliffe et al, 2003).

O autismo também pode estar relacionado a alterações do metabolismo celular, tal como na doença ou disfunção mitocondrial (Filipek et al, 2003). A fenilcetonúria não tratada também tem sido descrita como causa metabólica de autismo, mas não se sabe se a fenilcetonúria é responsável pelo atraso mental grave ou pelo déficit específico da via da dopamina nestes indivíduos (Baieli, 2003). Estudos clínicos relatam níveis elevados de ácido úrico em até um quarto dos pacientes com autismo e melhora de sintomas com terapia metabólica anti-hiperuricosúrica. Isto representa uma proporção significativa de casos, mas não tem sido amplamente avaliado e validado. Nem mesmo os genes responsáveis pela elevação de ácido úrico nos pacientes com TEA foram identificados (Page & Coleman, 2000).

Embora a relação entre o autismo, causas genéticas e ambientais serem aceitas pelo meio científico, esse número é pequeno em relação ao total de casos de TEA sem causas estabelecidas. Em estudos de base populacional de crianças com autismo, os casos com causas estabelecidas representam uma minoria, aproximadamente 10% dos indivíduos com autismo. Mesmo assim, estudos familiares indicam que a genética desempenha papel causal importante na maioria dos indivíduos com autismo sem causa estabelecida (Fombonne, 2002; Chakrabarti & Fombonne, 2001).

4.4 ABORDAGEM GENÔMICA PARA TEA

No final da década de 1980, foram realizados estudos com objetivo de avaliar a herdabilidade para o autismo em gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Foi encontrado que o autismo apresenta alta influência genética, com índices de herdabilidade de 0,85 – 0,92. Estes dados foram reavaliados por Smalley e colaboradores que encontraram risco de recorrência em gêmeos monozigóticos de 64% e de 9% para gêmeos dizigóticos (Monaco & Bailey, 2001).

Nesse sentido, foram realizados estudos em famílias, conduzidos pela Universidade da Califórnia, que encontraram risco de recorrência de 8,6%, e para famílias com duas ou mais crianças afetadas, o risco se aproximou de 35%, com evidências indicando que parentes de primeiro grau também apresentam maior risco que outros indivíduos os quais não apresentem parentesco afetado (Messinger et al, 2013).

Quanto a influência do sexo sobre o número de casos de autismo, o risco de recorrência para TEA em famílias em que uma criança apresenta o transtorno variou de 4%, se a primeira criança afetada for do sexo feminino, e 7% caso seja do sexo masculino (Folstein & Piven, 1991).

Outro indicador de influência genética do autismo é que as crianças que se encaixam nos critérios de diagnóstico comportamentais de TEA, quando avaliados geneticamente apresentam alterações em 15 a 40% dos indivíduos (Schaefer & Mendelsohn, 2008).

Alterações em um único gene são responsáveis por menos de 20% dos indivíduos com TEA, enquanto o restante apresenta outros fatores genéticos ou poligênicos causais que podem ser afetados por ações de ordem epigenéticas e influenciadas pelo ambiente (El-Fishawy & State, 2010). Assim, há necessidade do auxílio dos testes genéticos e avaliações clínicas cada vez mais apurados na busca de uma causa para o TEA.

A capacidade de diagnóstico genético relatado na literatura varia de 6 a 40% (Schaefer et al, 2010) e os distúrbios mais comuns envolvendo um gene estão também relacionados à síndrome do X frágil e esclerose tuberosa (Devlin & Scherer, 2012). Quando se faz a avaliação genética destes indivíduos são observadas anomalias cromossômicas em aproximadamente 7-8% dos pacientes com TEA e os resultados mais consistentes com autismo é o achado de X - frágil e a duplicação materna 15q11-13 (Xu et al, 2004). Por isso, na tentativa de incrementar a capacidade de diagnóstico, é recomendável na literatura o uso de teste por *microarrays* como primeiro teste de triagem para TEA (Battaglia et al, 2013).

As avaliações cromossômicas por microarranjos são capazes de identificar variação do número de cópias (CNVs), que são segmentos de DNA que variam de um a vários quilobases ou até megabases, presente em número variável de cópias e de forma variável também em cada indivíduo. Se apresentam como ganhos (duplicação), perdas (deleções), ou rearranjos complexos. Podem envolver um ou vários genes e afetar a função deste gene interrompendo uma região codificante com alelo dominante ou recessivo, interrompendo a função reguladora, gerando um gene quimérico, ou gerando modificações estruturais de posição do gene no cromossomo. A função das CNVs ainda não foi totalmente compreendida, no entanto, sua contribuição na variação genômica tem se destacado por abranger mais nucleotídeos do que o número total de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (Redon et al, 2006).

Quanto a formação de CNV, a região genômica é influenciada por segmentos homólogos com pequeno número de repetições de cópias (LCR), que se localizam flanqueando esta região. Estas são geradas por recombinação homóloga não alélica (NAHR), que então, favorecem deleções ou duplicações nesta região como por exemplo, na Síndrome da deleção/duplicação 22q11.2 e na duplicação recíproca na Síndrome Williams-Beuren (Stankiewicz & Lupski, 2002) conforme demonstrado na Figura 1. Por outro lado, as CNVs podem não estar associadas a nenhum fenótipo evidente, mesmo as grandes CNVs que envolvam múltiplos genes (Sebat et al, 2004).

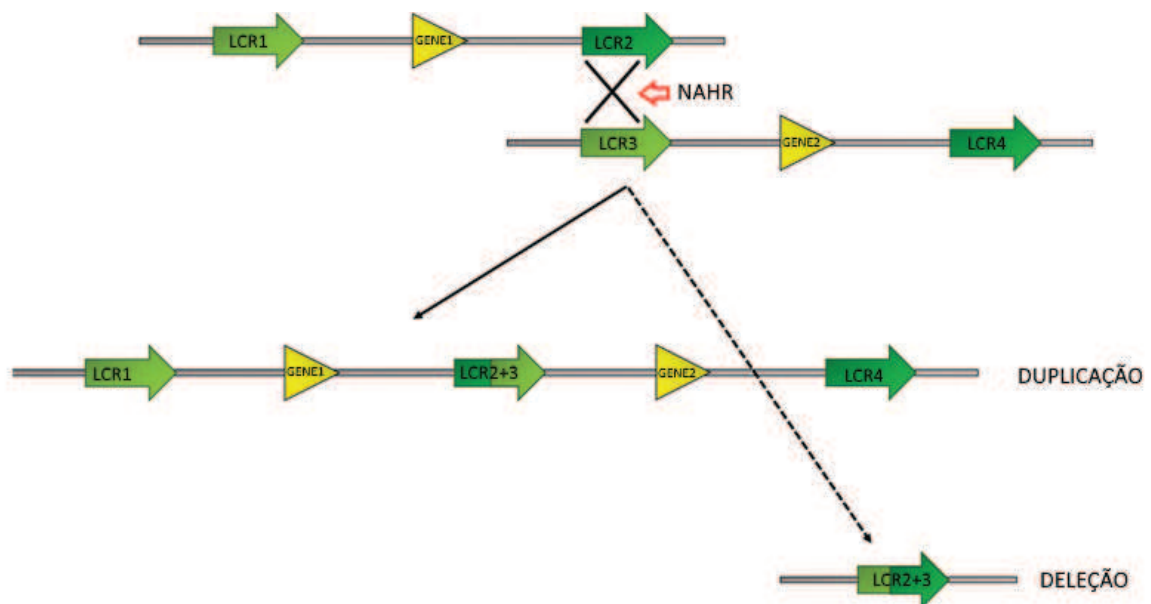


Figura 1. Mecanismo de formação de CNVs por NAHR por influencia de LCR. Adaptado de Mental and Behavioural Disorders and Diseases of the Nervous System » "Challenges in Parkinson's Disease", book edited by Jolanta Dorszewska and Wojciech Kozubski, ISBN 978-953-51-2464-1, Print ISBN 978-953-51-2463-4, Published: August 24, 2016 under CC BY 3.0 license.

O Colégio Americano de Genética Médica (ACMG - do inglês, *American College of Medical Genetics*) sugere que os testes para avaliação de CNVs devam ser utilizados como teste de primeira escolha na avaliação pós-natal inicial de indivíduos com TEA (Manning & Hudgins, 2010). Para tanto, o Colégio Canadense de Genética Médica (CCMG - do inglês, *Canadian College of Medical Genetics*) recomenda a técnica de Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA) como a investigação laboratorial de primeira escolha em casos em que não forem encontradas evidências sobre o autismo após avaliação histórica completa e exame físico (Duncan et al, 2009).

O CMA é uma técnica citogenômica que supera a resolução limitada da citogenética convencional e permite a ampla cobertura do genoma para as alterações cromossômicas microscópicas e submicroscópicas. Cada avaliação genômica por CMA é realizada em um chip que apresenta resolução dez vezes superior a resolução das investigações realizadas por cariótipo com bandeamento G. Tendo em vista que o cariótipo consegue diagnosticar rearranjos cromossômicos com tamanho de 5 – 10 Mb correspondendo a 3 – 5% dos indivíduos com deficiência intelectual idiopática e de 3 – 6% quando estes indivíduos são avaliados por FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*), enquanto CMA consegue avaliar alterações com até 100 Kb o que possibilita um incremento ao diagnóstico de até 25%. O uso desta técnica tem permitido a descoberta de genes candidatos ao TEA, tornando-se o CMA a técnica mais conhecida de estudos de CNV para distúrbios pediátricos (Connolly & Hakonarson, 2012; Miller et al, 2010; Battaglia et al., 2013).

Em 2010, a Padronização Internacional de Arranjos em Citogenômica (ISCA) realizou uma avaliação em 33 estudos publicados com 21.698 pacientes encaminhados para as investigações de alterações do desenvolvimento, deficiência intelectual, anomalias congênitas múltiplas, e TEA e concluiu que CMA oferece uma capacidade de diagnóstico de 15 a 20% superior a encontrada no cariótipo convencional que apresenta capacidade diagnóstica de 3% dos casos investigados, excluindo o diagnóstico de síndrome de Down e outras aberrações cromossômicas reconhecíveis (Miller et al, 2010). A ISCA, portanto, propôs o uso do CMA no lugar do cariótipo como o teste de diagnóstico citogenético de primeira linha para pacientes com estas indicações.

No mesmo ano, o Consórcio de Colaboração no Diagnóstico do Autismo em Genética Clínica / DNA avaliou 933 pacientes com TEA, utilizando diferentes metodologias na busca do melhor diagnóstico, encontraram que o cariótipo com bandeamento G apresentou resolatividade de 2,23%, teste para X frágil com rendimento de 0,46%, ambos menos sensíveis em

comparação com o método CMA, que foi capaz de detectar anormalidades clinicamente significativas em 7% dos pacientes. Eles concluíram que, apesar da interpretação relativamente complicada de CNVs *de novo* ainda com significado desconhecido, o CMA deve ser considerado como parte da avaliação inicial de diagnóstico de pacientes com TEA (Shen et al, 2010).

Em 2007, Sebat e colaboradores relataram o primeiro estudo de CNVs em famílias com caso de TEA. Foram identificadas CNVs relacionadas ao autismo em 12 (10%) indivíduos dos 118 pacientes previamente diagnosticados com autismo. Adicionalmente, foram identificadas CNVs em 2 (3%) de 77 indivíduos que apresentavam parentes em primeiro grau afetado. Dos 196 indivíduos do grupo controle, 2 deles (1%) também apresentaram CNVs relacionadas ao autismo. As CNVs associadas ao autismo foram identificadas em 17 loci de 11 cromossomos, sugerindo que vários genes estejam envolvidos na patogênese do TEA (Sebat et al, 2007).

A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados de diversos estudos realizados em diferentes coortes para avaliação de CNV e TEA e muitos destes estudos são de impacto no campo da pesquisa do autismo, como relatado pela Coordenação da Comissão de autismo do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (<http://iacc.hhs.org/>).

Tabela1. Conclusões de diferentes coortes de CNVs em indivíduos com TEA

Conclusões	Autores
CNVs contribuem com < 1% para susceptibilidade ao TEA	Marshall et al, 2008; Weiss et al, 2008; Kumar et al, 2008; Glessner et al, 2009
CNVs são de 3 a 5 vezes maior em famílias com TEA do que nos grupos controles, e é maior em famílias simplex do que multiplex *	Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Weiss et al, 2008; Kumar et al, 2008
27% dos pacientes com fenótipo típico de TEA apresentam CNVs <i>de novo</i>	Jacquemont et al, 2006; Morrow et al, 2008
40% das CNVs são herdadas de pais sem características de TEA	Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Jacquemont et al, 2006
Muitas CNVs estão em regiões haploinsuficientes e algumas atuam recessivamente com exclusão de ambas as cópias de um gene em famílias consanguíneas	Morrow et al, 2008
CNVs aparecem em mesmo locus de indivíduos não relacionados, como: duplicação 15q11-q13; deleções / duplicação em 16p11.2; duplicação em 17p11.2	Marshall et al, 2008; Szatmari et al, 2007; Weiss et al, 2008; Kumar et al, 2008; Christian et al, 2008; Jacquemont et al, 2006; Glessner et al, 2009; Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Weiss et al, 2008; Kumar et al, 2008; Christian et al, 2008; Glessner et al, 2009; Weiss et al, 2008
CNVs, TEA e genes associados a complexos sinápticos: <i>SHANK2</i> , <i>SHANK3</i> , <i>NRXN1</i> , <i>NLGN4</i>	Sebat et al, 2007; Marshall et al, 2008; Szatmari et al, 2007; Weiss et al, 2008; Jacquemont et al, 2006; Morrow et al, 2008; Glessner et al, 2009
CNVs, TEA e genes em distúrbios neuropsiquiátricos e do desenvolvimento neurológico: <i>TDAH</i> , <i>SZ</i> , e <i>ID</i>	Marshall & Scherer, 2012

*Simplex: um filho com TEA. Multiplex: mais de um filho com TEA.

Em um estudo desenvolvido por Jennifer e colaboradores (2013) foram avaliados, pela técnica de microarray, 215 pacientes com TEA ou deficiência de aprendizagem. Os resultados revelaram que um em cada cinco pacientes apresentaram alguma microdeleção ou microduplicação relevante quando avaliado por esta metodologia. O cromossomo 15 foi encontrado como o cromossomo mais comum relacionado ao TEA, conforme relatado anteriormente na

literatura por Schroer et al, 1998. Este estudo ainda revelou que dos pacientes com TEA, 13 dos 65 (20%) apresentaram pelo menos uma anormalidade na análise por microarray. Nestes 13 pacientes foram encontradas 14 alterações, incluindo 6 alterações que favorecem o fenótipo de TEA (36%) e 8 com significado desconhecido (64%). Ainda em relação aos 13 pacientes, 3 (23%) tinham uma história familiar de TEA, 3 (23%) tinha macrocefalia, e 4 (31%) tinham características dismórficas. Nenhum dos pacientes com TEA e com resultados de microarranjos alterados apresentavam histórico de convulsões. O intervalo de tamanho das CNVs destes pacientes foi de 966 ± 1.464 Kb.

Importante notar que diferentes CNVs exibem graus de penetrância diferentes para TEA dependendo de vários fatores, incluindo a função do gene afetado (Weiss et al, 2008; Kumar et al, 2008; Glessner et al, 2009). As CNVs com maior impacto sobre o autismo normalmente são de origem *de novo* e são encontradas com maior frequência associada a sintomas mais graves, por exemplo, deleção 15q11-q13, deleção 16p11.2 e 22q13 envolvendo o gene *SHANK3*. Algumas têm efeitos moderados ou leves e exigirão um segundo estímulo para atuar sobre o fenótipo de TEA, por exemplo, deleção 15q11.2 (de Kovel et al, 2010), deleção 16p12.1, (Girirajan et al, 2010) e algumas mutações em *SHANK2* (Leblond et al, 2012). Outras demonstram variação fenotípica e podem ser observadas em indivíduos que não apresentam TEA, sendo que as CNV que geram deleções, são responsáveis por maior gravidade no fenótipo em todo o espectro de doenças do desenvolvimento neurológico em comparação com as que geram duplicações (Cook & Scherer, 2008; Coe et al, 2012).

Por vezes, os ganhos e perdas que envolvem múltiplos genes no mesmo locus podem levar a fenótipos sobrepostos ou muito diferentes. Outros fatores potenciais independentes e que merecem atenção são fatores epigenéticos e ambientais. Todos esses fatores precisam ser considerados com cuidado na interpretação e posterior aconselhamento genético para uma doença complexa como TEA (Cook & Scherer, 2008).

4.4.1 Genes Candidatos

Muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de compreender a associação entre genes e autismo. Com isso, é crescente a busca de painéis de genes e de marcadores genéticos comuns para grupos de famílias com mais de um filho com autismo (multiplex), bem como na pesquisa citogenética para anormalidades hereditárias ou *de novo* de forma individual. Usando vários marcadores, os cromossomos são avaliados quanto a regiões que apresentem pontos de quebra, translocações, duplicações e deleções. Estas regiões podem então ser examinadas quanto à presença de genes que são potencialmente envolvidos na patogênese do TEA (Rebecca et al, 2004).

As alterações citogenéticas encontradas no locus 15q11-q13 por exemplo, são encontradas com maior frequência em pacientes com TEA, variando de 1 a 4% (Herzing et al, 2001). Vários estudos populacionais e relatos de casos têm descrito duplicações, (Gurrieri et al, 1999; Herzing et al, 2002; Bolton et al, 2001) deleções, (Schroer et al, 1998; Nurmi et al, 2001) e inversões (Wolpert et al, 2001; Borgatti et al, 2001) neste locus. As duplicações podem ocorrer como repetições em tandem e intersticiais (de tal modo que múltiplas cópias deste locus podem estar presentes no cromossomo) ou como um cromossomo isodicentrico supranumérico 15 (um cromossomo 15 extra com 1 ou 2 cópias da região 15q11-q13), levando a trissomia ou tetrassomia de genes do locus 15q11-q13 (Sutcliffe et al, 2003). Algumas duplicações são herdadas de origem materna e parecem causar autismo por genes não silenciados (Filipek et al, 2003). Vários pesquisadores descreveram um “fenótipo - cromossomo 15 ” em indivíduos com duplicações em regiões deste cromossomo, estabelecendo graus variáveis por ataxia, atraso de linguagem, epilepsia, deficiência intelectual e dismorfologia facial (Borgatti et al, 2001; Boyar et al, 2001).

As alterações citogenéticas da região 15q11-q13 apresentam vários genes alvos que devem ser investigados bem como seus produtos, por exemplo, o ácido gama amino butírico (*GABAA*). Trata-se do produto de um grupo de genes e estão associados também aos genes dos receptores deste produto (genes de três subunidades receptoras: *GABRB3*, *GABRA5* e *GABRG3*). Estão fortemente relacionados a patogênese do autismo, dado o seu envolvimento na inibição das vias neurais excitatórias e a sua expressão no desenvolvimento neuronal (Owens & Kriegstein, 2002). Isso foi demonstrado em ratos deficientes em *GABRB3* os quais apresentaram epilepsia e alterações eletroencefalográficas, bem como déficit de aprendizagem e de memória remanescentes, assim como em pacientes com TEA (Huntsman et al, 1999; DeLorey et al, 1998). Estudos de desequilíbrio de ligação (DL) também apontaram para o

envolvimento da região do gene *GABAA*. Descobriram DL em marcadores próximos ao gene *GABRB3* e ao gene *GABRG3* (Martin et al, 2000; Bass et al, 2000).

Outro gene no locus 15q11-q13 de origem herdada é o gene *UBE3A*, presente na síndrome de Angelman. A expressão de *UBE3A* é predominantemente no cérebro humano, e é regulada por mecanismos complexos envolvendo imprints e possivelmente silenciamento (Herzing et al, 2002).

Em um estudo de uma população autista usando marcadores abrangendo região de translocação conhecida, 15q11-q13, os pesquisadores encontraram DL com um marcador a 5' do gene *UBE3A*, favorecendo uma possível relação entre o gene da síndrome de Angelman e o autismo (Nurmi et al, 2001). Já foram encontrados casos de indivíduos que apresentam alteração na região 15q11-q13 mas que não desenvolveram TEA, o que sugere que a mutação exclusiva nesta região e envolvendo estes genes não é suficiente para causar o autismo evidenciando a necessidade de múltiplos genes de susceptibilidade em diferentes cromossomos (Rineer et al, 1998).

Alterações cromossômicas também foram encontradas na região 7q22-q33 (Yan et al, 2000; Scherer et al, 2003). A proteína reelina (*RELN*) é codificada por genes localizados nesta região, a qual foi definida como região susceptível a translocações cromossômicas. Reelina é uma grande glicoproteína secretada potencialmente durante o desenvolvimento fetal com ação sobre região de migração neural (Hong et al, 2000). Destaca-se por se ligar a receptores neuronais e pode estar relacionada a patologia do autismo por estes indivíduos apresentarem disfunções nestas células (Bailey et al, 1998). Tais disfunções afetam o desenvolvimento cortical e cerebelar e a atividade neuronal cerebelar, sendo estes os achados patológicos mais robustos no autismo (Kemper & Bauman, 2002). Outro estudo observou uma associação entre indivíduos com TEA e uma longa repetição de trinucleotídeos polimórficos localizados a 5' da região do gene *RELN*, e por análise de Western blot de córtex cerebelar *postmortem* a partir de 5 indivíduos com autismo demonstraram uma redução de 44% nos níveis de proteína RELN em comparação com 8 indivíduos do grupo controle não-autistas (Persico et al, 2001).

Numerosos outros genes estão sob investigação no locus 7q22-q33. Uma pesquisa analisou o cromossomo 7 e seus pontos de interrupção em 3 pacientes com autismo. Estes pontos de interrupção estavam localizados em 3 regiões diferentes e afetaram os genes *FOXP2*, *NPTX2* (pentaxina neuronal 2), e um RNA transcrito não codificado e marcado por TCAG 4133353 (Scherer et al, 2003). O gene *NPTX2* parece estar relacionado a origem sináptica excitatória e se localiza em 7q22.1. Já, ambos *FOXP2* e TCAG 4133353 estão silenci-

ados em pacientes com distúrbios de fala e linguagem e, portanto, a região 7q31-q33 é designada uma região da linguagem e da fala (Lai et al, 2000). Distúrbios da linguagem e da comunicação constituem um traço fundamental do fenótipo autista e estudos mostram que familiares de indivíduos com autismo têm taxas mais elevadas de dificuldades sociais e de comunicação que os indivíduos controle (Folstein & Mankoski, 2000). A mutação do gene *FOXP2* foi identificada em uma análise genética de uma família britânica não autista com distúrbios de linguagem e do desenvolvimento da fala (Lai et al, 2001). Embora os membros da família não apresentem autismo a importância do gene *FOXP2* no autismo é relevante (Newbury et al, 2002). Existem outros genes na região 7q31-q33 como o gene *IMMP2L*. Este gene também foi identificado como local de um ponto de interrupção cromossômica em um paciente com síndrome de Tourette e autismo, (Petek et al, 2001). Bem como o gene *RAY1 / ST7* também na região 7q31-q33, foi encontrado bloqueado por um ponto de interrupção de translocação em uma criança com autismo (Vincent et al, 2000).

Os ensaios citogenéticos e o sequenciamento de todo genoma, são técnicas para a identificação de genes relevantes, independente de uma hipótese associada a fisiopatologia do autismo. Com isso, aumenta-se a possibilidade destes estudos empíricos encontrarem genes envolvidos a distúrbios de linguagem, defeitos de neurotransmissores, ou anormalidades metabólicas no autismo que de outra forma seriam negligenciados. Em contrapartida, há necessidade de estudos conduzidos por hipóteses que possam prever o envolvimento de alguns genes candidatos com base em evidências clínicas e empíricas. Por exemplo, um pesquisador poderá observar redução dos sintomas do TEA com certas intervenções farmacológicas e depois comparar as diferenças nos genes que regulam os respectivos metabolitos endógenos em pacientes afetados, em relação a indivíduos controle (Rebecca et al, 2004). Os estudos de associação são cruciais neste tipo de pesquisa, não só por avaliar polimorfismos em genes selecionados sem evidências anteriores de análise citogenética ou genômica, mas também porque não há evidência empírica de que o produto do gene pode estar relacionado a patogênese da doença. Inibidores da recaptação da serotonina, antagonistas da dopamina, e algumas drogas adrenérgicas apresentam efeitos favoráveis sobre os sintomas comportamentais do autismo; portanto, os genes que codificam para os receptores de neurotransmissores ou destas substâncias são alvos para estes tipos de estudos genéticos (McDougle & Posey, 2002).

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

- Investigar CNVs de ganho e de perda, pela técnica CMA, em pacientes com indicação clínica para TEA.

5.2 Objetivos Específicos

- Aplicar a entrevista Escala de Avaliação do Autismo na Infância (CARS).
- Aplicar a entrevista Revisada de Diagnóstico de Autismo (ADI-R).
- Avaliar o padrão de distribuição de CNVs para pacientes com suspeita clínica de TEA.
- Apresentar os principais genes que possam estar potencialmente envolvidos com TEA nos pacientes diagnosticados.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Seleção dos Participantes

Foram encaminhados, por médicos assistentes das redes municipal e estadual de saúde, ao Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás (NPR) e ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene/SES-GO) 8 pacientes com indicação clínica de TEA. Após esclarecimentos sobre o projeto, os responsáveis pelos pacientes foram convidados a participar do estudo e todos concordaram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A figura 2 ilustra o fluxograma de seleção dos pacientes e os ensaios laboratoriais que foram realizados para a confirmação do diagnóstico clínico. Os pais e/ou responsáveis pelo paciente com suspeita de TEA passaram por uma entrevista estruturada usando o Questionário Escala de Avaliação do Autismo na Infância (CARS, do inglês *Childhood Autism Rating Scale*) e o Questionário Revisado de Diagnóstico de Autismo (ADI-R, do inglês *Autism Diagnostic Interview-Revised*).

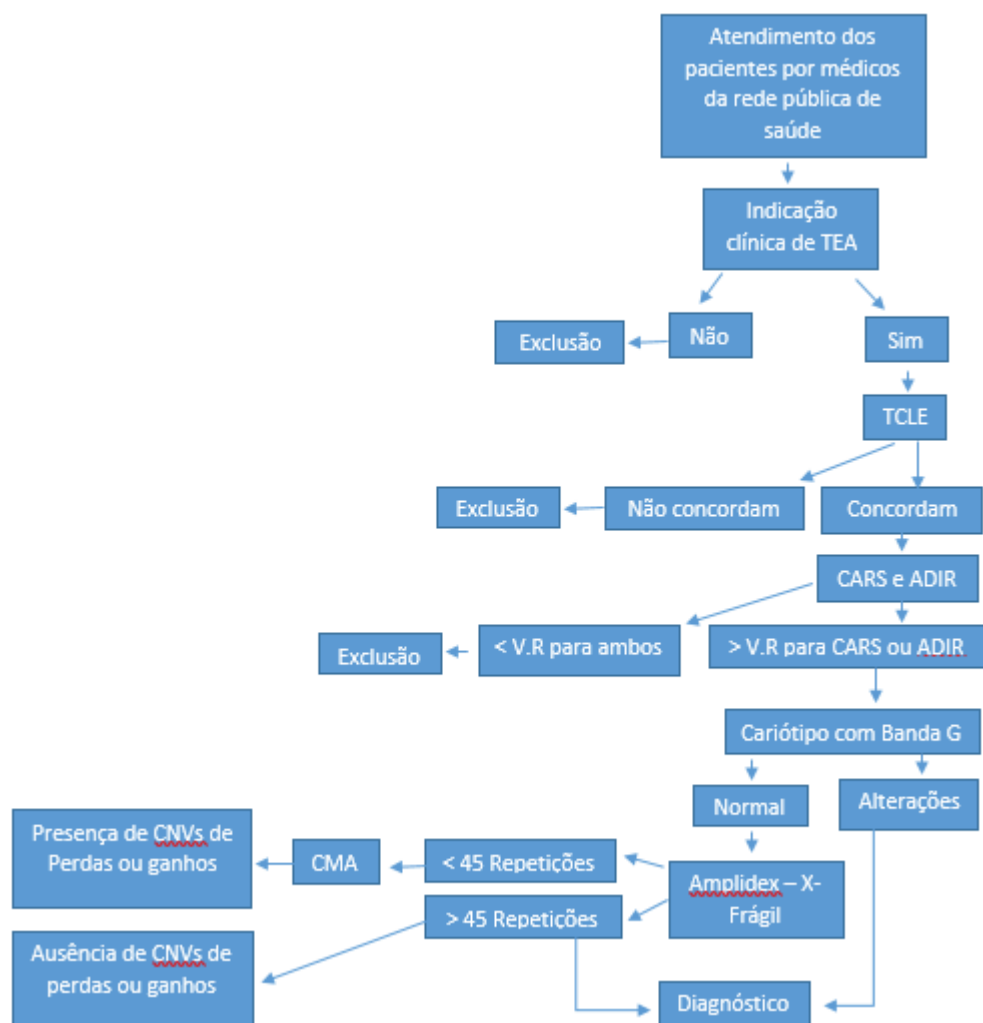


Figura 2: Fluxograma indicando o encaminhamento, seleção, triagem e metodologias utilizadas na tentativa de elucidação diagnóstica de casos de TEA. V.R: Valor de Referência.

6.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com indicação clínica de Transtorno do Espectro do Autismo, cujos pais e/ou responsáveis concordarem voluntariamente em assinar o TCLE.
- Pacientes que pontuarem no questionário ADI-R ou CARS.

6.1.2 Critérios de Exclusão

- Pais ou responsáveis que não concordarem em assinar o TCLE.
- Pacientes com idade inferior a 2 anos de idade.
- Pacientes que não obtiverem pontuação acima dos scores estabelecidos na entrevista ADI-R ou CARS.
- Pacientes que apresentarem resultado positivo para X frágil.
- Pacientes que apresentaram alterações numéricas e/ou estruturais no cariótipo.

6.2 Aplicação dos Questionários CARS e ADI-R

O CARS é um questionário a ser aplicado a pais ou responsáveis de indivíduos com suspeita de TEA. Foi utilizado, neste trabalho, para definir a presença deste transtorno e mensurar o grau de comprometimento em leve, moderado ou acentuado, ou mesmo para excluir essa condição, principalmente no que tange a crianças com comprometimento do desenvolvimento sem TEA. É um teste muito utilizado no auxílio ao diagnóstico do autismo e por isso foi traduzido e validado para vários idiomas incluindo o português (Brasil) (Pereira et al, 2008). Pode ser aplicado em crianças maiores de dois anos de idade e é composto de 15 itens que avaliam 14 aspectos geralmente presentes em indivíduos autistas sendo: relações pessoais, imitação, resposta emocional, uso corporal, uso de objetos, resposta a mudanças, resposta auditiva, resposta ao uso sensitivo, medo e nervosismo, comunicação verbal, comunicação não verbal, nível de atividade, resposta intelectual, além de um item referente a impressão causada ao condutor da aplicação. A criança é avaliada usando uma escala de pontuação de 1 a 4 com pontuações intermediárias de meio ponto (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4). Em seguida, é feito o somatório da pontuação obtida que pode variar de 15 a 60 pontos. A pontuação indica ausência, ou o grau de comprometimento da criança assim definido: 15 – 29: ausência de autismo, 30 – 36: autismo leve – moderado e > 36: autismo grave.

O ADI-R (do inglês, *Autism Diagnostic Interview, Revised* – Entrevista de Diagnóstico de Autismo, Revisado) é uma entrevista realizada com pais ou responsáveis de crianças maiores de dois anos de idade com suspeita de TEA que já foi traduzida e validada para ser aplicada em português (Brasil). Inclui 93 itens em três áreas de observação e comportamento:

anormalidades de interação social recíproca (A), anormalidades de comunicação (B) e padrão comportamental restrito, repetitivo e estereotipado (C). Um quarto item corresponde a idade em que os sintomas de TEA se manifestaram (D) que deve ser preenchido somente quando os sintomas se iniciarem antes 36 meses. Todos os itens no ADI-R são codificados para comportamento atual e anterior. Além das três áreas de avaliação de comportamento citados acima, os indivíduos também são avaliados quanto a idade em que as anormalidades de desenvolvimento tornaram-se evidentes, tendo por parâmetro 36 meses de idade.

Cada resposta a questão aplicada corresponde a uma pontuação que é convertida, com base em uma tabela do questionário, em um score. Os scores das áreas de comportamento específicas (A, B, C e D) são somados e a presença ou não de características autísticas é determinada pelos pontos de corte, incluindo o item correspondente à idade de início de sintomas sendo: A = 10; B = 8 (para indivíduos que apresentam fala consistente = verbal); B = 7 (para indivíduos que não apresentam fala consistente = não verbal); C = 3 D = 1.

6.3 Coleta e Processamento das Amostras

Após assinatura do TCLE foram obtidas as amostras biológicas dos pacientes, correspondendo a 10 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA e heparina separadamente.

6.3.1 Cariótipo com Bandas G

As amostras de sangue periférico heparinizado foram submetidas à cultura de linfócitos T conforme protocolos convencionais para a obtenção de metáfases. Para a análise do cariótipo por bandas G, as lâminas foram envelhecidas por sete dias e posteriormente tratadas e coradas. Para a análise cromossômica, as metáfases foram capturadas com auxílio de microscopia de luz e analisadas pelo software IKaros (*Metasystems Corporation*).

6.3.2 Extração e Quantificação das Amostras de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA IllustraBloodGenomicPrep® Mini Kit (GE Healthcare, EUA). A quantificação da concentração de DNA (ng/μL) existente em cada amostra foi realizada em um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Ambos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos sugeridos pelos fabricantes.

6.3.3 Pesquisa para X-frágil por Detecção de Repetições CGG no Gene FMR1

Para a realização desse ensaio foram utilizados DNA extraídos de sangue periférico dos pacientes selecionados. Após a extração, foi realizada reação de PCR com iniciadores específicos, de acordo com o kit AmplideX® FMR1 PCR (Asuragen), seguindo as instruções do fabricante. Esse ensaio é específico para a detecção de repetições CGG do gene *FMR1*, sendo capaz de detectar mutações completas em pelo menos 1300 repetições CGG e as pré-mutações. Após a reação de PCR, foram realizadas corridas eletroforéticas em um sequenciador de capilar (3500, *Applied Biosystems*).

6.3.4 Análise Cromossômica por Microarray

A CMA foi conduzida em um GeneChip CytoScan HD® (Affymetrix – Estados Unidos da América, EUA), uma matriz de genotipagem abrangente para o genoma humano. Esta matriz apresenta ampla cobertura do genoma e maior desempenho para a análise de alterações cromossômicas humanas, sendo capaz de detectar variações genéticas estruturais.

O CytoScan HD[®] possui mais de 99% de sensibilidade na detecção de CNVs, determinação de perda de heterozigose (LOH) e baixos níveis de mosaicismo. A matriz do chip possui cerca de 2,6 milhões de cópias de marcadores, incluindo aproximadamente 750 mil SNPs e cerca de 2 milhões de sondas não polimórficas. As sondas que integram o chip apresentavam tamanho de 25 pb.

6.3.4.1 Descrição do Método de Genotipagem *Array*

A 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 amplificado no ensaio. As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13º nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido à localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip.

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, 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 AGCC[®] (Affymetrix, EUA) gerando arquivos CEL, e as análises dos dados foram realizadas pelo software Chromosome Analysis Suite[®]2.0 (ChAS[®], Affymetrix, EUA). Os arquivos CEL obtidos pelo escaneamento dos chips foram usados para estabelecer os genótipos.

A seleção das CNVs encontradas foi baseada na comparação com os bancos de dados do próprio Cytoscan HD[®] (Affymetrix, EUA) bem como de um outro banco de dados denominado DGV (*The Data Base of Genomic Variants*). A relação das informações contidas em ambos bancos de dados se deu por inclusão de achados de CNVs encontradas na população, mas que não revelavam fenótipo de relevância, sendo então definidas como comuns.

As duas principais métricas de controle de qualidade do GeneChip[™] HD array foram *Median Absolute Pairwise Difference* (MAPD) e SNP-QC, escores que se aplicam para mar-

cadores de número de cópias e SNP, respectivamente. Para o cenário do presente estudo foram usados os parâmetros de MAPD ≤ 0.25 e de SNP-QC ≥ 15 .

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi realizado em 8 indivíduos, sendo 6 do sexo masculino e 2 do sexo feminino, com faixa etária entre 2 a 15 anos de idade, que foram encaminhados ao NPR-PUC Goiás / LaGene/LACEN/SES com indicação clínica de TEA, por médicos da rede pública de saúde (SUS).

Os responsáveis pelos pacientes assinaram o TCLE atestando autorização para utilização de seus dados com finalidade de pesquisa. Assinaram também autorização para divulgação em banco de dados de pesquisa genética: DECIPHER (do inglês, Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources - Banco de Dados de Desequilíbrio Cromossômico e Fenótipo em seres Humanos utilizando o Ensembl) e também forneceram informações para preenchimento de protocolo de atendimento com informações clínicas de relevância. Concordando com as condições e assinando documentação necessária os responsáveis pelos pacientes participaram da aplicação de entrevista de triagem – CARS (do inglês, *Childhood Autism Rating Scale* – Escala de Classificação de Autismo na Infância), com a finalidade de definir se os indivíduos com indicação clínica de TEA de fato apresentavam algum grau de comprometimento que caracterizasse o distúrbio. Ao final da aplicação da entrevista foi gerada uma pontuação com base nas respostas obtidas. A pontuação define, em uma primeira etapa, a presença ou não de características que sugerem TEA. Dos oito indivíduos avaliados, seis apresentaram pontuação acima do score mínimo para definição de comprometimento autista, sendo os scores assim definidos: 15 a 29 sem autismo, 30 a 36 autismo leve-moderado e 37 a 60 autismo grave conforme demonstrado na Tabela 2.

Em seguida, os responsáveis responderam a uma série de perguntas que compunham a entrevista denominada ADI-R, com a finalidade de definir qual tipo e grau de comprometimento autista o indivíduo apresentava. Após a realização desta entrevista foram gerados scores que demonstravam grau de comprometimento compatíveis com a indicação clínica demonstrados na Tabela 2.

Após a aplicação dos questionários para inclusão dos pacientes no estudo, os 8 indivíduos passaram pela etapa de coleta de material biológico. Nesta etapa foi coletado sangue periférico de cada indivíduo para realização do cariótipo, pesquisa para X-frágil e CMA. O primeiro teste realizado foi o cariótipo com bandeamento G que não revelou alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais (46, XX ou 46, XY).

Tabela 2. Resultados de questionários, entrevistas e testes genéticos dos pacientes com indicação de TEA incluídos no estudo

PROBANDO	CARS	ADIR	Cariótipo	X-Frágil (Repetições CGG)
1	30	A = 11; B = 6; C = 0; D = 5	46, XX	28-31***
2**	48	A = 19; B = 16; C = 6	46, XY	31
3*	34,5	A = 22; B = 12; C = 6; D = 5	46, XY	29
4*	42,5	A = 22; B = 7; C = 3; D = 4	46, XY	29
5	36	A = 12; B = 11; C = 4; D = 3	46, XY	283
6	32,5	A = 20; B = 11; C = 0; D = 5	46, XX	Indeterminado
7	26	A = 20; B = 8; C = 6; D = 4	46, XY	30
8	23	A = 13; B = 8; C = 2; D = 3	46, XY	30

Valor de referência: CARS: 15 a 29 = sem autismo. 30 a 36 = autismo leve-moderado. > 37 = autismo grave.

ADIR: A = 10; B = 8 (verbal); B = 7 (não verbal); C = 3 D = 1 (aplicável para sintomas antes 36 meses). Sendo (A) anormalidades de interação social recíproca, (B) anormalidades de comunicação, (C) padrão comportamental restrito, repetitivo e estereotipado e (D) corresponde a idade em que os sintomas de TEA se manifestaram que deve ser preenchido somente quando os sintomas se iniciarem antes 36 meses. X-Frágil: < 45 repetições CGG = Normal; 45 a 54 = intermediário; 55 a 200 = pré-mutação; > 200 = mutação completa. *Não Verbal. ** Início dos sintomas após 36 meses. *** Correspondente aos dois alelos.

Posteriormente à realização do cariótipo, os 8 pacientes foram avaliados quanto a presença de repetições de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMRI*, com a finalidade de distinguir os indivíduos que apresentavam síndrome do X-frágil (SXF), dos indivíduos com TEA. Os resultados encontrados revelaram ausência de repetições que caracterizasse a SXF em 6 dos 8 pacientes avaliados. O indivíduo TEA05 apresentou resultado acima do valor de referência (V.R), com 283 repetições CGG o que caracteriza mutação completa para o gene *FMRI*, portanto ele recebeu o diagnóstico para SFX e por isso, foi excluído da etapa seguinte que é a realização do CMA. O paciente TEA06 apresentou resultado indeterminado, sendo necessário repetição da técnica para confirmação e exatidão do resultado obtido por isso também não foi avaliado por CMA (Tabela 2).

Os 6 pacientes que apresentaram ausência de alterações na avaliação para X-frágil seguiram para a etapa de realização da técnica de CMA para serem avaliados quanto a presença de ganhos e perdas genômicas. Após a identificação das CNVs de ganho ou perda foram identificados e analisados os genes de relevância para TEA, sendo considerados como tal, os genes que apresentassem qualquer associação com sinais fenotípicos presentes no TEA ou a distúrbios de origem e função relacionados ao sistema neurológico. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de CMA de indivíduos com indicação clínica de TEA confirmada após realização do questionário ADIR

Caso	Idade (anos)	Sexo	CNV	Citobanda	Tamanho (Mb)	Número de Marcadores	Nomenclatura do Microarranjo	Número de Genes	Genes Mórbidos
TEA01	11	F	Ganho	2q12.2	0,24	200	2q12.2q12.3(107,462,999-107,709,215)x4	1	<i>ST6GAL2</i>
			Perda	5p13.2	0,33	308	5p13.2(37,347,389-37,680,413)x1	2	<i>NUP155, WDR70</i>
			Perda	14q11.2	0,4	648	14q11.2(22,560,402-22,959,362)x1	0	-
			Ganho	15q13.3	0,44	572	15q13.3(32,003,537-32,444,044)x3	1	<i>CHRNA7</i>
			Ganho	Xp22.33	0,37	379	Xp22.33(892,247-1,262,195)x3	0	
TEA02	15	M	Ganho	6p12.1	0,15	200	6p12.1(55,225,841-55,378,830)x3	2	-
			Ganho	Xp22.32	0,1	66	Xp22.32(4,718,199-4,819,652)x2	0	-
TEA03	15	M	Ganho	6q27	0,28	278	6q27(168,333,307-168,611,331)x3	4	-
			Perda	15q11.2	0,13	118	15q11.2(24,348,989-24,478,406)x1	1	<i>PWRN2</i>
			Ganho	22q11.23	0,26	83	22q11.23q12.1(25,649,258-25,911,104)x3	3	-
TEA04	9	M	Ganho	5p15.33	0,43	178	5p15.33(676,872-1,104,489)x3	8	<i>TPPP</i>
			Perda	14q11.2	0,48	720	14q11.2(22,461,403-22,943,573)x1	0	-
			Ganho	16p11.2	0,31	176	16p11.2p11.1(34,449,594-34,755,816)x3	3	-
			Perda	Xp11.23	0,12	94	Xp11.23(47,879,110-47,997,394)x0	4	<i>ZNF630, SSX6, SPACA5</i>
TEA07	2	M	Ausente						-
TEA08	3	M	Ausente						-

PROBANDO TEA 01

Probando do sexo feminino. Filho de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto, 35 e 25 anos respectivamente. Probanda com 11 anos e 3 meses de idade quando da assinatura do TCLE. A irmandade incluía três meninos saudáveis de 17 e 12 anos e um meio irmão materno de 5 anos. Apresenta dois tios maternos com má formações físicas sem identificação de origem. Família sem história prévia de abortamento. O probando apresentava altura de 1,40m e peso de 14Kg, boa socialização, distúrbios motores e da fala. No encaminhamento, o médico assistente apresentou a indicação clínica de retardo mental grave com comportamento autista de provável etiologia genética.

Em relação ao ganho que encontramos na região 2q12.2 com 240 Kb de tamanho (figura 3A), os achados na literatura envolvendo o cromossomo 2 e TEA são evidentes. No entanto, estes achados se apresentam como perdas genômicas em tamanho muito superiores ao identificado em nosso estudo o que permite a sua observação pela técnica de cariótipo (Newbury et al, 2008, Casas et al, 2004). O gene *ST6GAL2* encontrado nesta região foi relatado expresso em células de neuroblastoma, bem como seus diferentes transcritos foram encontrados no córtex cerebral humano. A proteína hST6Gal II também foi detectada nas quatro áreas do córtex cerebral. Portanto, com base na correlação dos fatores de transcrição potencialmente envolvidos na regulação do *ST6GAL2*, pode-se supor que hST6Gal II possa ser necessária durante o desenvolvimento do cérebro, para funções seletivas do tipo celular no cérebro e possivelmente em condições patológicas. De fato, foi demonstrado que o locus genético ligado à encefalopatia necrótica aguda autossômica dominante (ADANE) contém quatro genes incluindo *ST6GAL2*. Embora nenhuma mutação tenha sido encontrada nas regiões de codificação destes genes, não se pode excluir mutações nas sequências promotoras que poderiam alterar a expressão dos genes (Lehoux et al, 2010).

Dentre os achados referentes a este paciente, destacamos um ganho na região 15q13.3, com 440 Kb de tamanho, 572 marcadores e envolvendo o gene *CHRNA7* (Figura 3B). Alguns estudos revelaram fenótipos de TEA em pacientes com CNV's de ganho e de perda na região 15q11-q13, destacando a região 15q13.3. Duplicações em toda a região 15q11-q13 se dividem em duas categorias: as que não envolvem a região das síndromes de PraderWilli e Angelman (região crítica de Prader-Willi / Angelman, PWACR), estas duplicações parecem ser sem efeito clínico, são geralmente familiares e podem ser consideradas como um polimorfismo normal e a segunda categoria de duplicações inclui a região PWACR, se apresentam como familiar ou *de novo* em sua origem e foram encontradas em associação com atraso no desenvolvimento e

TEA (Bolton et al, 2001). Estima-se que 1% dos indivíduos com TEA apresentem essa duplicação associada a Prader-willi/Angelman, sendo herdada matematicamente. No entanto, nosso achado corresponde apenas a região 15q13.3, sendo, portanto, bem menor que a região 15q11-q13 relatada.

Nesse sentido, dado a complexidade genotípica dos achados em duplicação e a presença de achados fenotipicamente normais relacionados as CNV's de ganho nesta região, as análises de sequência da região de codificação têm sido investigadas principalmente em pacientes portadores de microdeleção (Masurel-Paulet et al., 2010). Informações relacionadas a deleções nesta região serão melhor detalhadas no paciente TEA 03, já que este apresenta uma perda em 15q11.2.

Adicionalmente, foram encontrados na literatura, casos de CNV's de duplicação relevantes envolvendo a região encontrada neste paciente, como a CNV envolvendo o gene *CHRNA7* em 15q13.3, relatada por Masurel-Paulet, et al. (Masurel-Paulet et al., 2010). O gene *CHRNA7* foi citado, ainda por este estudo, como principal gene associado ao TEA que também foi identificado em nosso estudo. Mesmo assim, e apesar de considerarem que *CHRNA7* seja o gene causador de diversas doenças neurológicas, os estudos não possibilitam fazer associação direta entre o achado genético e o fenotípico devido ao número limitado de casos relatados (Bacchelli et al, 2014; Butler et al, 2014), por isso se faz necessário ampliar o número de relatos e o uso de metodologias mais sensíveis, como sequenciamento, para que novos casos sejam avaliados com objetivo de ampliar os achados genômicos para TEA.

Em relação ao achado envolvendo o cromossomo X, destacamos que existem muitos casos de associação entre as mais diversas alterações genéticas referentes a este cromossomo e a deficiência intelectual (DI). Mas é importante lembrar que a DI, está também frequentemente associada ao autismo, presente em até 30% dos casos de TEA e 67% de autismo clássico, sendo observadas mutações em vários genes no cromossomo X em indivíduos com DI que também explicam o fenótipo autista, sugerindo que autismo e DI podem compartilhar uma etiologia genética comum (Bhat et al, 2008; Piton et al, 2008). Isto pode ser observado no caso de uma microdeleção de 167 kb de tamanho envolvendo o gene *PTCHD1* na região Xp22.11 (Noor et al, 2010). Nesse sentido, destacamos nosso achado em Xp22.33 com 370 Kb de tamanho e 379 marcadores que, diferentemente do caso relatado, trata-se de um ganho envolvendo região Xp22 e que não foi observado envolvimento de genes (Figura 3C).

Em relação a perda encontrada em 5p13.2 (Figura 4A) existem relatos na literatura de pacientes com TEA associados a ganho e não à perda nessa região. Como no trabalho de Van, et al. (Van et al, 2016) que descreveu quatro casos de indivíduos com ganhos nessa região apresentando tamanho aproximado de 180 Kb. Destes, 3 apresentavam mutação envolvendo o gene *SLC1A3* e o único indivíduo que não havia sido diagnosticado com TEA possivelmente teria diagnóstico conclusivo assim que a idade lhe permitisse preencher tais critérios. Quanto aos genes *WDR70* e *NUP155*, já foram descritos dois casos de indivíduos apresentando duplicação no cromossomo 5 com 1,07 e 0,33 Mb de tamanho, respectivamente. As CNVs encontradas em ambos apresentavam os genes *WDR70* e *NUP155*, dentre outros genes envolvidos. Além disso, ambos indivíduos apresentavam atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual (Yan et al, 2008).

Encontramos também uma perda em 14q11.2 com 400 Kb de tamanho e com 648 marcadores, mas não observamos genes de relevância para TEA nesta região (Figura 4B). Essa mesma alteração também foi observada no paciente TEA04. No entanto, há estudos destacando que nessa região está localizado o gene *CHD8* e que a haploinsuficiência deste gene já foi encontrada em pacientes com TEA e/ou distúrbios do desenvolvimento, demonstrando associação entre TEA e deleções nessa região, mas envolvendo o gene *CHD8* o que não foi observado em nossos resultados pela técnica de CMA (O'Roak et al., 2012; Neale et al., 2012). A ausência de detecção de CNV por essa metodologia não exclui a possibilidade de mutações pontuais nesse gene, portanto o emprego de técnicas de investigação com maior poder de resolução, como sequenciamento de última geração, pode ampliar os achados genéticos associados ao TEA.

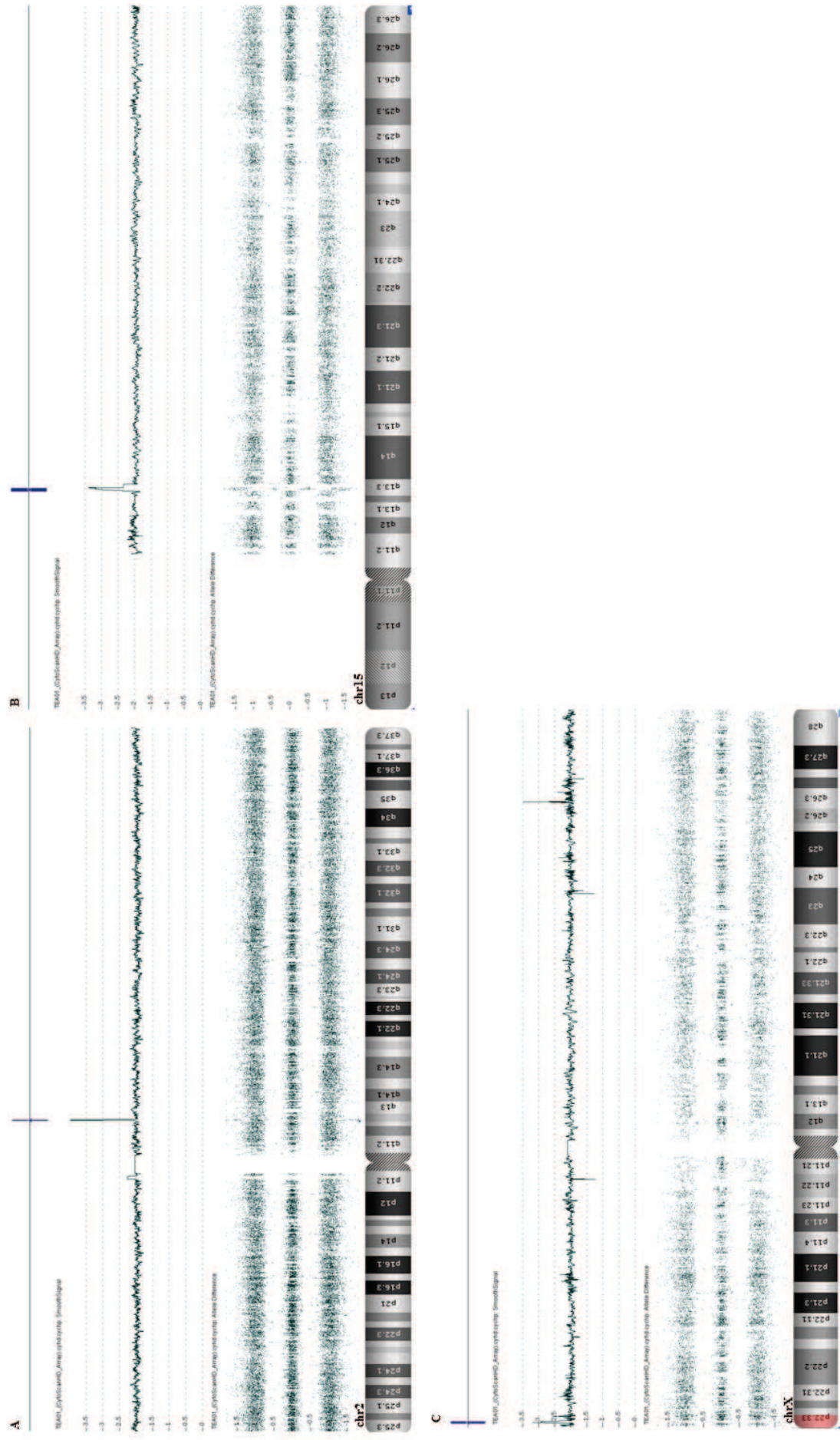


Figura 3. Análise por CMA demonstra presença de ganho nas regiões 2q12.2 (A); 15q13.3 (B) e Xp22.33 (C), representada pela barra azul, de indivíduos com indicação clínica para TEA

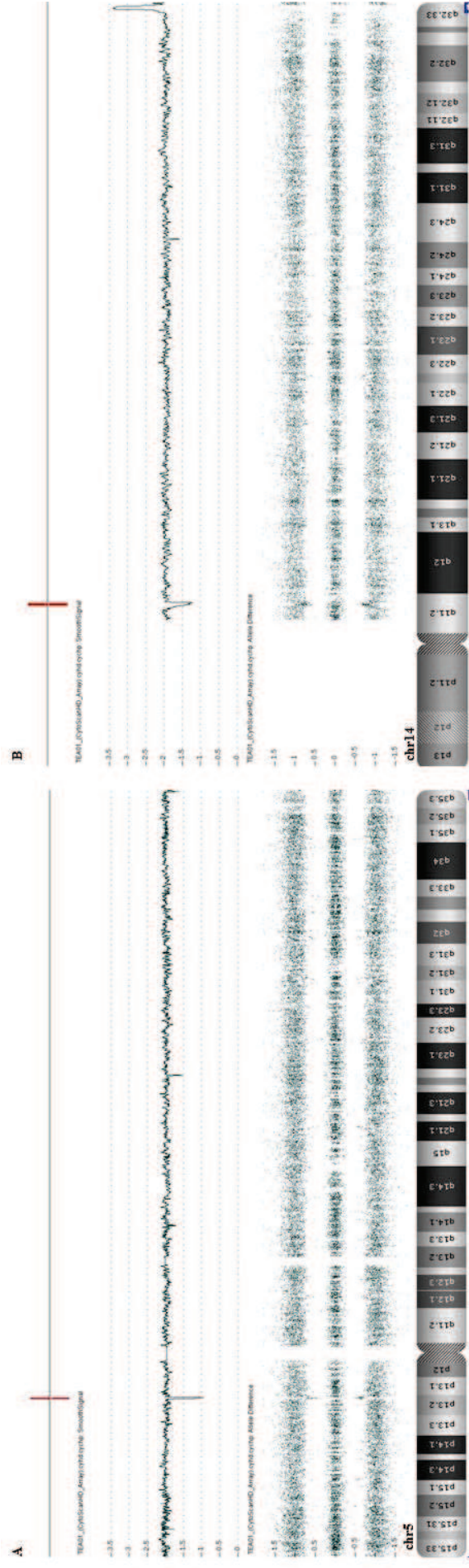


Figura 4. Análise por CMA demonstra presença de perda nas regiões 5p13.2 (A) e 14q11.2 (B), representada pela barra em vermelho, de indivíduos com indicação clínica para TEA.

PROBANDO TEA 02

Probando do sexo masculino, com 15 anos e 2 meses de idade quando da assinatura do TCLE. Primeiro filho de casal não consanguíneo, mãe gestante aos 36 anos de idade, mesma idade do pai. A irmandade incluía dois meio irmãos, crianças saudáveis, sendo uma menina de 28 e um menino de 24 anos. Apresenta um tio materno com má formação física de provável origem bacteriana (meningite). Família sem história prévia de abortamento. O probando apresentava altura de 1,67m e peso de 70Kg, boa socialização, apresentando movimentos estereotipados e distúrbios da fala. No encaminhamento, o médico assistente apresentou a indicação clínica de hiperatividade, estereotípias motoras e comportamento sugestivo de autismo.

Em relação aos achados no cromossomo 6, a literatura descreve alguns casos de associação ao TEA, não especificamente relacionado a região a qual encontramos nossos resultados (Figura 5A). Destes casos descritos um estudo demonstrou seis indivíduos com deleções sobrepostas na região 6p22.3-p24.3. Eles apresentaram características comuns da síndrome de deleção 6p, mas também anormalidades neurológicas ou comportamentais, incluindo atraso na fala, TEA, hiperatividade / TDAH e/ou outras anormalidades comportamentais. Os fenótipos comportamentais, destes casos relatados, foram classificados como TEA de acordo com o teste ADOS-G e entrevista ADI-R. Dentre estes casos, destacamos um indivíduo de 18 anos de idade, com deficiência intelectual grave, TEA e com alterações no eletroencefalograma. O probando apresentou uma deleção com 1 Mb de tamanho na região cromossômica 6p22.3 encontrada pela técnica de CGH-array, semelhante ao nosso achado (Benedetto et al, 2013).

Foi observado um ganho em Xp22.32, com 100 Kb de tamanho e com 66 marcadores (Figura 5B). Esse achado é semelhante ao relatado também no paciente TEA01. Por isso, também difere quanto ao achado de Noor, et al. (Noor et al, 2010) no que diz respeito a um ganho e não a uma perda, mas corresponde quanto a proximidade gênica relatada, Xp22.11.

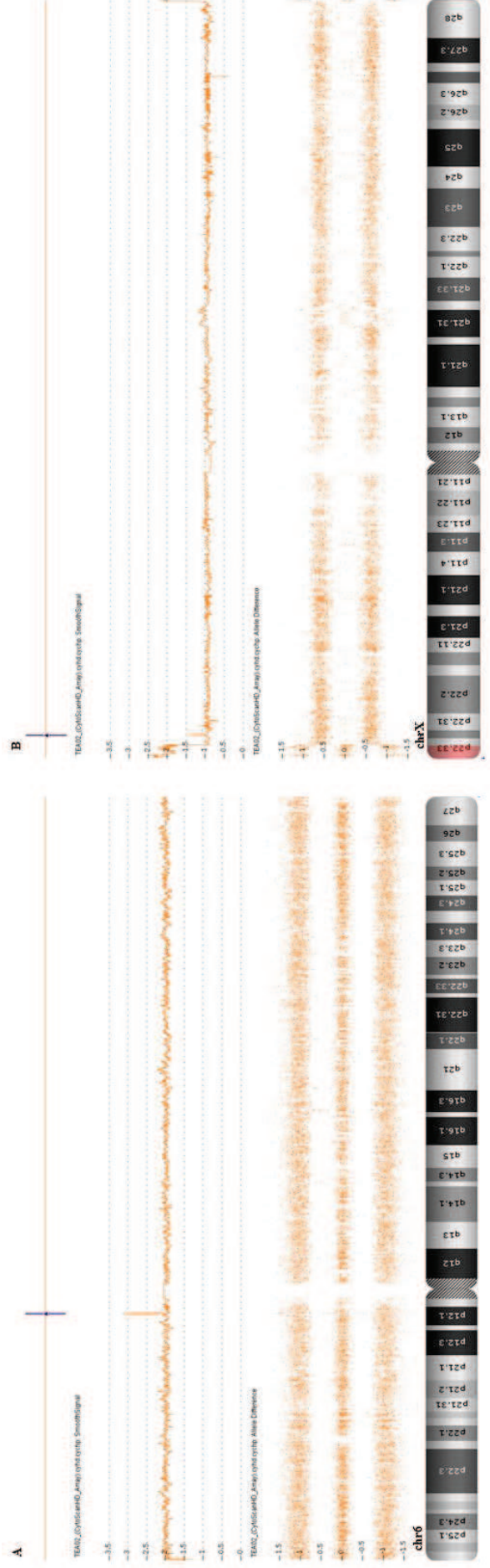


Figura 5. Análise por CMA demonstra presença de ganho nas regiões 6p12.1 (A) e Xp22.32 (B), representada pela barra azul, de indivíduos com indicação clínica para TEA.

PROBANDO TEA 03

Probando do sexo masculino, com 15 anos e 5 meses de idade quando da assinatura do TCLE. Primeiro filho de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto 28 e 34 anos respectivamente. A irmandade incluía uma irmã saudável de 8 anos de idade. Apresenta prima em terceiro grau com provável diagnóstico de autismo. Família sem história prévia de abortamento. O probando apresentava isolamento social, episódios de pânico noturno durante o sono, atraso no desenvolvimento motor e da fala, alterações neurológicas em 3 sítios aracnóides a esquerda em região da fala confirmados por tomografia de crânio. No encaminhamento, o médico assistente descreveu presença de pregas epicânticas, ptose palpebral e laringomalácia, com indicação clínica de transtorno do espectro autista.

Assim como no probando TEA 03 também observamos um ganho no cromossomo 6 na região 6q27, com 280 Kb de tamanho, apresentando 278 marcadores (Figura 6A). Como já citado no probando TEA 03, não são comuns ganhos nessa região associados ao TEA.

Encontramos neste paciente uma perda na região 15q11.2, com 100 Kb de tamanho, apresentando 66 marcadores e envolvendo o gene *PWRN2* (Figura 6B). Importante ressaltar que o cromossomo 15 possui cinco pontos de quebra na região proximal do braço longo. Eles são referidos como BP1-BP5. Existe uma região apresentando um conjunto de cópias de DNA de baixa repetição (LCR do inglês, *Low Copy Repeats* – Repetições de poucas cópias) localizado dentro desta região cromossômica. Estas LCR's favorecem o desalinhamento no processo de pareamento durante a meiose, levando à recombinação homóloga não alélica (NAOH do inglês, *Non Allelic Homologous Recombination* - recombinação homóloga não alélica). Estas LCR's contêm pseudogenes e os pontos de quebra encontrados em BP1, BP2 e BP3 foram caracterizados pela presença do gene *HERC2* (na BP3) e dos pseudogenes *HERC2* (na BP1 e na BP2) (Pujana et al, 2002).

A síndrome de Prader-Willi (PWS) e a síndrome de Angelman são tipicamente causadas por uma deleção de diferentes origens parentais envolvendo o ponto de quebra distal em BP3 e pontos de quebra localizados próximos a BP1 ou BP2. Estas deleções citogenéticas da região 15q11-q13 do cromossomo são classificadas como tipo I (envolvendo BP1 e BP3) ou tipo II (envolvendo BP2 e BP3). As deleções de tipo I têm um comprimento genômico médio de 6,58 Mb enquanto que as deleções de tipo II têm um comprimento médio de 5,33 Mb (Butler et al, 2008). Vários estudos demonstraram que os indivíduos com deleções maiores que as deleções típicas de 15q11-q13 tipo I, presentes tanto nas síndromas de Prader-Willi como na de Angelman, apresentam sintomas de neurodesenvolvimento mais graves em comparação

com aqueles indivíduos com a deleção tipo II, que se apresenta de menor tamanho (Bittel et al, 2006; Milner et al, 2005).

Nesse sentido, Varela e colaboradores (Varela et al, 2005) relataram que os indivíduos com PWS com deleções em 15q11-q13 do tipo I apresentavam atraso no desenvolvimento da fala em relação aqueles com deleções de tipo II. Hartley e colaboradores (Hartley et al, 2005) encontraram que indivíduos com PWS com deleções de tipo I apresentavam alterações comportamentais e sinais de depressão mais evidentes do que indivíduos com deleções de tipo II. Sahoo e colaboradores (Sahoo et al, 2007) também relataram que em indivíduos com síndrome de Angelman e deleção 15q11-q13 tipo I apresentavam significativamente maior comprometimento comportamental e cognitivo e menor habilidade linguísticas expressiva, com isso uma maior probabilidade de características para o TEA. Adicionalmente, Cox e Butler (Cox e Butler, 2015) em um estudo de revisão com 200 indivíduos apresentando microdeleção em 15q11.2, encontraram que 27% apresentavam TEA. No entanto, nem todos os 200 indivíduos apresentavam anormalidades fenotípicas, seja esta de qualquer tipo. Distúrbios neuropsiquiátricos, de comportamento e características dismórficas leves foram observados na maioria destes indivíduos, mas foi notável também uma penetrância incompleta e expressividade variável. Alterações próximas a esta região também foram encontradas no paciente TEA01, mas com um ganho em 15q13.3

Quanto ao gene *PWRN2* ele tem por função não codificar proteínas, como esperado para maioria dos genes, mas transcrevem molécula de RNA. Está localizado entre os genes *NDN* e *C15orf2*. Ao pesquisar genes na região de síndrome de Prader-Willi no cromossomo 15, seguido por análise de banco de dados e RT-PCR de testículo, Buiting et al. (2007) obtiveram vários transcritos referentes a *PWRN2*. Os transcritos diferiram devido ao splicing e poliadenilação, e todos se apresentavam como não codificantes. A RT-PCR detectou a expressão de *PWRN2* apenas nos testículos, enquanto um outro gene, membro da mesma família, *PWRN1*, foi encontrado também nos rins e sistema nervoso (Buiting et al. 2007). Portanto, ainda não existem relatos da contribuição deste gene para o desenvolvimento de TEA.

Nós encontramos, ainda nesse indivíduo, ganho em 22q11.23, com 260 Kb de tamanho e 83 marcadores (Figura 6C). Alguns casos foram relatados na literatura envolvendo esta região, mas análises genéticas foram indicadas por características fenotípicas não autísticas e que são mais comuns na síndrome Velocardiofacial ou DiGeorge, como dismorfia facial e anomalias cardiovasculares. Já em relação a associação com características de TEA, foi relatado um caso o qual foi sugerido que o fenótipo autista se justificava por consanguinidade dos

pais, sugerindo também que uma mutação recessiva adicional pudesse contribuir para o fenótipo observado (Mukaddes et al, 2007). Essa hipótese, entretanto, foi rejeitada, como relatado nos trabalhos de De Braekeleer, et al (1996) e Jorde, et al (1990) que indicaram exatamente o contrário (Ramelli, 2008).

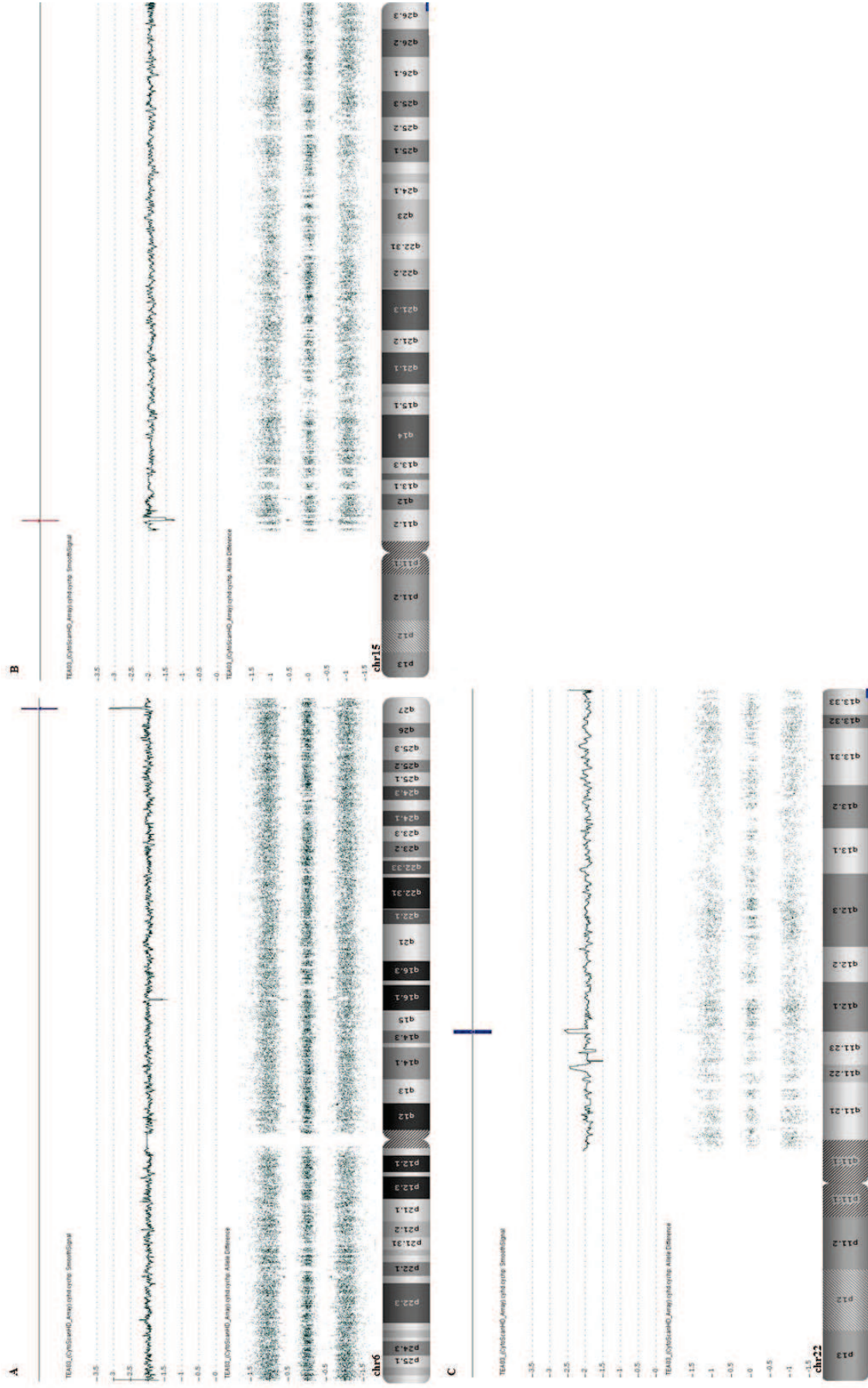


Figura 6. Análise por CMA demonstra presença de ganho na região 6q27 (A) e perda em 15q11.2 (B) e ganho em 22q11.23 (C), representada pelas barras azul e vermelha, respectivamente, de indivíduos com indicação clínica para TEA.

PROBANDO TEA 04

Probando do sexo masculino. Terceiro filho de casal não consanguíneo, com 9 anos e 8 meses de idade quando da assinatura do TCLE. A irmandade incluía três crianças sendo dois meninos um de 13 e outro de 11 anos de idade, este último com diagnóstico de deficiência intelectual leve, e uma menina com 6 anos. As crianças foram acolhidas em abrigos por abandono dos pais e uso de diversas substâncias ilícitas incluindo, maconha e crack, mesmo durante a gravidez. Idade dos pais não informada. No encaminhamento, o médico assistente apresentou a indicação clínica de atraso na fala, atraso cognitivo, prognatismo, hipertelorismo e sintomas autísticos.

Em relação ao nosso achado de ganho presente em 5p15.33, com 430 Kb de tamanho e 178 marcadores (Figura 7A), foi relatado na literatura um caso de CNV envolvendo também esta região. Trata-se do caso de um indivíduo com várias alterações fenotípicas, dentre as quais diagnóstico de TEA estabelecido por entrevista ADI-R, mas que diferentemente do nosso achado, apresentou perda e não ganho nessa região, além de outras perdas em 3p24.3-3p25, e 18q12. Fortalecendo ainda mais a característica fenotípica de TEA, sua irmã também apresentou autismo, mas sem nenhuma alteração genética encontrada por CMA. Ainda há um outro relato de deleção nessa região relacionada ao fenótipo de TEA que foi descrito por Vostanis et al, 1994 (Harvard et al, 2005). Quanto ao gene *TPPP* presente em 5p15.33, identificado em nosso estudo, estudos revelaram que metilação em regiões de genes associados a funções cerebrais como genes: *ID3*, *GRIN1* e *TPPP*, podem predispor a depressão em crianças. Esses genes são todos biologicamente relevantes no que diz respeito a resposta ao estresse, plasticidade neural e circuitos neurais. Além disso, *TPPP* tem função fundamental para a diferenciação de oligodendrócitos, e para desenvolvimento e manutenção da substância branca no cérebro (Weder et al, 2014).

Nós encontramos CNV's de perda no cromossomo 14q11.2, com 480Kb de tamanho e 720 marcadores (Figura 7B). Alguns estudos encontraram este mesmo achado associado ao TEA, como em um estudo tipo coorte, mas as microdeleções encontradas apresentavam também alterações referentes ao gene *CHD8* (O'Roak et al. 2012). Esta mesma condição também foi observada no paciente TEA01 sem alteração neste gene.

Como presente neste indivíduo, também foram encontradas em outros estudos, CNVs em 16p11.2 associadas ao TEA, mas diferentemente do ganho que observamos foram encontrados principalmente perdas nessa região (Figura 7C) (Golzio et al., 2012). No entanto, existem relatos de que há influencia a susceptibilidade ao autismo quando ocorre tanto ganhos

quanto perdas na região 16p11.2. Isto foi demonstrado ao avaliar um grupo de famílias de autistas de um grupo denominado Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) os quais foram encontrados cinco casos de deleção *de novo* em 16p11.2. Foi observado a mesma alteração em outras 5 crianças de um outro grupo de 512 indivíduos com atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual ou suspeita de TEA, encaminhadas para o Hospital da Criança de Boston, bem como em outros 3 indivíduos de um outro grupo de 299 pessoas com autismo em uma população islandesa.

Já em relação a duplicação nesta região e de acordo com os três estudos citados acima, foram relatados 7 indivíduos do grupo de famílias AGRE e 4 das 512 crianças do grupo do Hospital da Criança de Boston que apresentaram duplicação na região 16p11.2. Importante destacar que a duplicação presente nessa região, parece ser um fator de risco de alta penetrância e que CNV's *de novo* em 16p11.2 explicam apenas uma parte dos casos de indivíduos com autismo idiopático familiar. Deleções e duplicações nesta região foram observados em quase 1% das famílias com autismo avaliadas nos estudos citados anteriormente, sendo: 1% dos indivíduos com autismo na Islândia e em mais de 1,5% das amostras clínicas de indivíduos com atraso no desenvolvimento. Esses eventos são tão frequentes ou mais frequentes do que a causa mais conhecida do autismo relatada na literatura, a duplicação da região de Prader-Willi/Angelman (Weiss et al, 2008).

Ainda quanto a região 16p11.2, quando avaliadas em paralelo, CNVs de ganhos e perdas em 16p11.2 foi observado que as deleções e as duplicações resultam em fenótipos clínicos e anatômicos contrastantes. A deleção está associada principalmente a distúrbios do desenvolvimento neurológico e pediátrico e a duplicação está associada a uma gama mais ampla de fenótipos psiquiátricos, que incluem transtorno bipolar, esquizofrenia e TEA (Kusenda et al, 2015).

Nesta região nós encontramos também alguns pseudogenes. Os pseudogenes são cópias de genes que apresentam alterações de sequência de codificação como frameshifts e presença de “stop” códons, mas se assemelham a genes funcionais. Estima-se que existam aproximadamente vinte mil pseudogenes, o que é comparável ao número de genes codificadores de proteínas em humanos. O conhecimento atual desses genes permanece mal compreendido e muitas dessas sequências são de fato genes de RNA funcionais e desempenham papéis no silenciamento gênico (Yusuf Tutar, 2012). Os pseudogenes encontrados neste indivíduo foram: LOC283914, LOC146481, LOC100130700.

Encontramos também CNVs de perda em Xp11.23, com 120 Kb de tamanho e 94 marcadores (Figura 7D). Existem relatos de caso de duplicação relacionados a essa região associados ao diagnóstico de TEA, bem como, casos relacionados a microdeleção, porém estes casos enfatizam genes que diferem dos encontrados em nosso trabalho (Bonnet et al, 2006; Qiao et al, 2008; Froyen et al, 2007). Quanto ao gene *SPACA5* encontrado nessa região, em corroboração ao nosso achado, já foi relatado caso de um menino com atraso no desenvolvimento, retardo do crescimento, TEA e características dismórficas, o qual apresentou, por CGH-Array, uma microduplicação na região Xp11.23. A microduplicação tinha 335,4 kb de tamanho e envolvia os genes: *ZNF81*, *ZNF182* e *SPACA5*. O achado foi confirmado por RT-PCR e FISH (Alesi et al, 2012).

Já em relação ao gene *ZNF630* sabemos que é expresso no cérebro adulto e durante o desenvolvimento fetal. É membro do grupo de seis genes da família de proteínas “Zinc Finger” presentes na região Xp11. Mutações em três genes pertencentes a esta família (*ZNF41*, *ZNF81* e *ZNF674*) demonstraram causar deficiência intelectual ligada ao X (Shoichet et al., 2003; Kleefstra et al., 2004; Lugtenberg et al., 2006b). Foi também descrito o caso de um paciente do sexo masculino com deficiência intelectual não síndrômica e uma duplicação de cerca de 1,3 Mb em Xp11.23p11.3, envolvendo também um outro gene da família “Zinc finger” (El-Hattab et al, 2011).

As proteínas “Zinc Finger” são a maior classe de proteínas de ligação do DNA codificadas no genoma humano. Como tal, elas desempenham um papel crítico na regulação de um grande número de importantes processos biológicos (Fietze et al., 2010). Especificamente *ZNF630* é flanqueado por uma duplicação segmentar de 16 kb de tamanho que apresenta mais de 99% de identidade entre si, contendo uma cópia de *SPACA5* cada. Em um estudo de investigação, referente a influência do papel desta duplicação segmentar sobre o gene *ZNF630*, pesquisadores mapearam a região Xp11 por PCR em 12 famílias e seis controles que continham uma deleção ou duplicação envolvendo *ZNF630*. Em todos os casos, foram observados pontos de quebra localizados dentro das regiões de duplicações que envolviam os genes *ZNF630*, *SSX6* e *SPACA5*, localizados em uma região de LCR. Os pontos de quebra também foram mapeados e foi evidenciado que estas regiões eram resultantes de NAHR.

Neste mesmo estudo, foram avaliadas seis coortes e foram identificadas 12 deleções em *ZNF630* em um total de 1.562 pacientes do sexo masculino com deficiência intelectual (0.77%). Já entre os 2.121 controles do sexo masculino sem deficiência intelectual, foram encontradas 10 deleções (0,47%). Esta diferença de 1,6 vezes não foi significativa (valor P =

0,174). Quanto a duplicações em *ZNF630* ocorreram em 0,72% e 1,36% nos 967 pacientes e 587 controles, respectivamente. A diferença de 1,9 vezes na frequência de duplicações de *ZNF630* também não foi significativa. Com isso, estes dados não suportam uma possível associação entre CNVs em *ZNF630* com deficiência intelectual. No entanto, isto não exclui o papel deste gene associado a outras características relacionadas ao TEA.

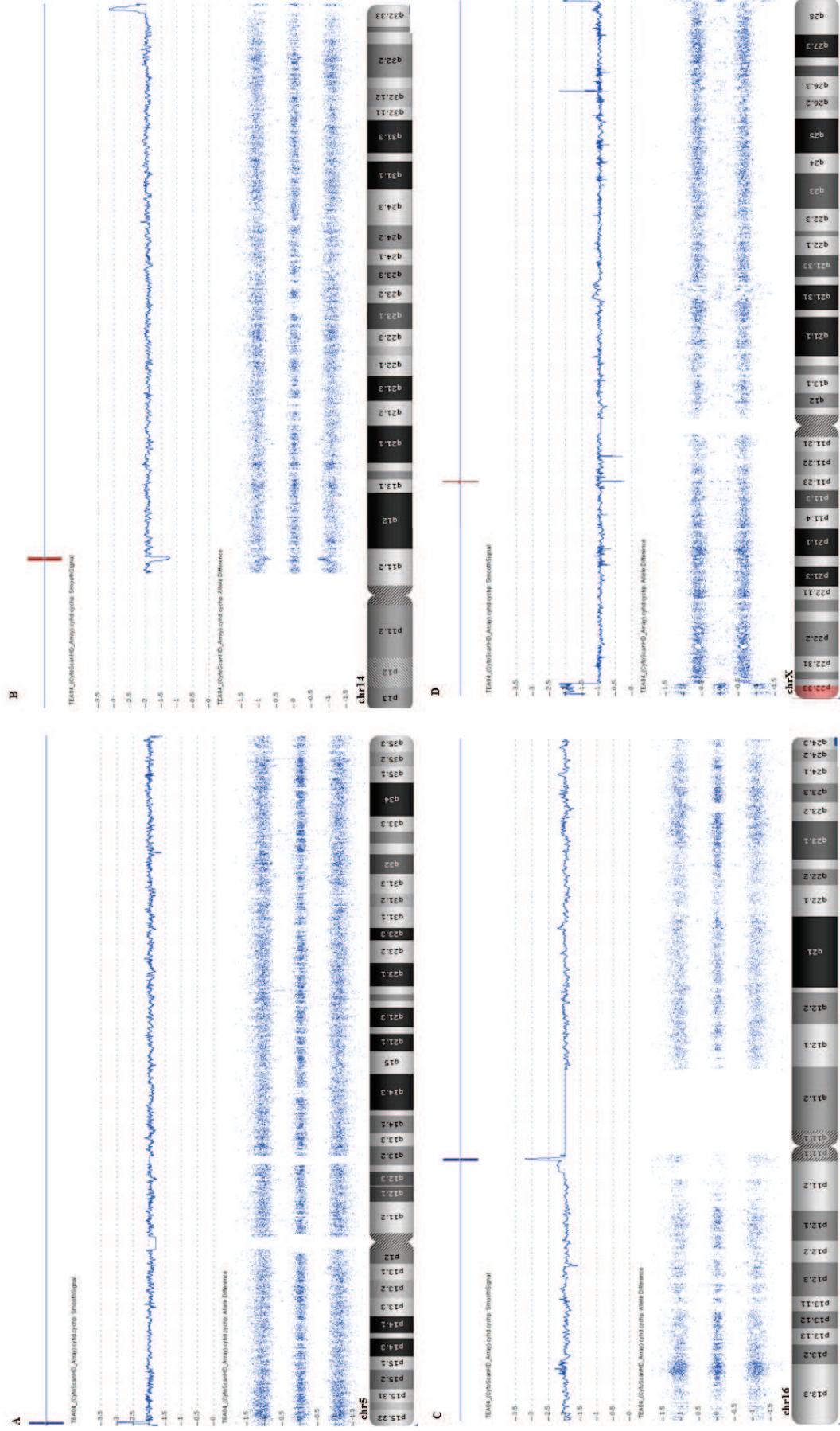


Figura 7. Análise por CMA demonstra presença de ganho nas regiões 5p15.33 (A) e 14q11.2 (B) e perda em 16p11.2 (C) e Xp11.23 (D), representada pelas barras azul e vermelha, respectivamente, de indivíduos com indicação clínica para TEA.

PROBANDO TEA 05, 06, 07 e 08

Probando TEA 05 trata-se de um indivíduo do sexo masculino, com 20 anos de idade quando da assinatura do TCLE. Filho de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto: 34 e 35 anos respectivamente. O probando apresentava indicação clínica de retardo mental grave, comportamento autístico e síndrome X-frágil.

Probando TEA 06 trata-se de um indivíduo do sexo feminino, com 7 anos e 9 meses de idade quando da assinatura do TCLE. Segundo filho de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto 26 e 25 anos respectivamente. A irmandade incluía um irmão saudável de 14 anos de idade e a mãe apresentou pequeno sangramento no 4º. mês de gestação. Família sem história prévia de abortamento. A probanda apresentava indicação clínica de comportamento autístico com comprometimento cognitivo.

Probando TEA 07 trata-se de um indivíduo do sexo masculino, com 2 anos e 2 meses de idade quando da assinatura do TCLE. Único filho de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto 34 e 32 anos respectivamente. Probando com casal de primos maternos em primeiro grau com diagnóstico de Síndrome de Asperger e Esquizofrenia. Família sem história prévia de abortamento. Mãe apresentou descolamento de placenta ao fim do 3º. mês de gestação e apresentou exposição ocupacional, controlada periodicamente via exame de sangue, a mercúrio. O probando apresentava indicação clínica de atraso no desenvolvimento da linguagem e dificuldade de interação, sugerindo comportamento autístico.

Probando TEA 08 trata-se de um indivíduo do sexo masculino, com 3 anos e 7 meses de idade quando da assinatura do TCLE. Probando gemelar de casal não consanguíneo. Idade do pai e da mãe no momento do parto 37 e 30 anos respectivamente. A irmandade incluía uma irmã saudável e a mãe se expunha ocupacionalmente com proteção a raios X. Família sem história prévia de abortamento. O probando apresentava indicação clínica de autismo atípico.

O probando TEA 05 apresentou 283 repetições CGG quando avaliado para X-frágil. Portanto não foi avaliado para CMA devido o diagnóstico já ter sido estabelecido para esta síndrome.

Já o probando TEA 06 apresentou resultado indeterminado para X-frágil, sendo necessário repetição da técnica para confirmação e exatidão do resultado obtido, por isso não foi avaliado por CMA.

Observamos que os pacientes TEA07 e TEA08 não apresentaram resultados com alterações quanto a presença de ganhos e perdas quando avaliados pela técnica de CMA. Interes-

sante observar que quando confrontamos estes dados com aplicação das entrevistas, observamos que, apesar de ambos apresentarem avaliações claramente acima do valor de referência e do score definido quando entrevistados pelo ADI-R, ambos apresentaram resultados abaixo da referência quando entrevistados para CARS. Estes indivíduos, foram também os mais jovens a serem avaliados, 2 e 3 anos, respectivamente. Com isso, podemos inferir um possível viés, causado pelas respostas dos entrevistados que buscam, a qualquer custo, um diagnóstico para seus filhos e que em uma entrevista mais objetiva como CARS, este tipo de viés pode estar menos presente. E ainda, podemos destacar a dificuldade de se observar determinadas características autísticas em indivíduos tão jovens, ainda que ambos questionários apresentem limites de idade compatíveis a maiores de dois anos.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quando avaliamos as regiões as quais encontramos CNVs de forma geral, observamos que nossos achados foram compatíveis com os relatados na literatura. Em um estudo de análise de CNVs *de novo* com 2.591 famílias, foi encontrado forte associação de TEA com os seguintes loci considerados de risco: 1q21.1, 3q29, 7q11.23, 16p11.2, 15q11.2-13 e 22q11.2 (Sanders et al, 2015). Destes, destacamos os 3 últimos os quais foram também identificados e apresentados em nossos resultados. Um outro estudo com 531 indivíduos brasileiros com TEA, encontrou loci com alta frequência de CNVs em 15q11-13, 16p11.2 e 22q13. A prevalência combinada destas regiões foi de 2,1% (11/531) (Moreira et al, 2014).

Ficou evidente, quanto a entrevista ADI-R, que todos os indivíduos, com exceção do paciente TEA01, apresentaram valores acima do score para pelo menos 3 das 4 áreas do comportamento avaliadas, indicando um fenótipo comportamental de maior graduação na maioria dos indivíduos. Além disso, estes scores sempre elevados inviabilizam a caracterização e o agrupamento destes indivíduos quanto a presença de alterações de comportamento que se destaque em relação a outros, formando praticamente um único grupo, fato limitado também pelo pequeno número de indivíduos avaliados.

Quanto ao sexo notamos um predomínio de indivíduos do sexo masculino, ocorrendo em 1/42 meninos contra 1/189 meninas, revelando um aumento de 4 a 5 vezes mais casos de TEA em meninos que em meninas. Ainda que nosso número amostral seja limitado, o achado está de acordo com o encontrado na literatura (Mitra et al, 2016, CDC 2014, Elsabbagh et al, 2012).

Nesta condição de amplitude gênica e caminhos genéticos e fenotípicos ainda pouco definidos, a heterogeneidade comportamental limita a compreensão dos achados. No entanto, os indivíduos geneticamente definidos poderão ser melhor conduzidos clinicamente e se beneficiarão dos achados moleculares referentes ao TEA (Bernier et al, 2014). É de conhecimento da comunidade científica que dentre estes achados existem mais de 100 genes e regiões genômicas associadas diretamente ao TEA e mais de 800 genes parecem atuar de alguma forma neste transtorno, além de vários estudos de microarranjos com CNVs que relatam que elas contribuem com cerca de 10% de todos os achados genéticos associados ao TEA. (Betancur, 2011; O'Roak et al. 2012). No entanto, ainda existem várias CNV's relacionadas ao TEA que carecem de melhor investigação, já que o amplo espectro do autismo e CNV's *de novo*, ante-

riormente não relatadas na literatura como patogênicas, podem indicar um novo achado genético ou sobreposição de fenótipos (Noor et al, 2010).

Assim, apesar dos estudos demonstrarem alta herdabilidade para o autismo e portanto, uma forte contribuição genética, a interação entre fatores genéticos e TEA ainda não está totalmente compreendida. Devido a baixa frequência de fatores genéticos comuns entre indivíduos com o transtorno e tendo como resultado toda literatura atual, o modelo multigênico é o modelo comumente aceito. Assumindo a característica multigênica como verdadeira, é possível afirmar que uma CNV poderia ser um dos vários fatores genéticos responsáveis pelo TEA. Estas CNVs ainda podem estar em indivíduos normais na população e, portanto, podem não ser reconhecidas em estudos de alterações *de novo* ou alterações específicas de TEA. Com isso, podemos dizer que algumas das CNV's que ainda não foram relatadas na literatura e que se apresentam como comuns na população, poderão futuramente contribuir para ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos moleculares subjacentes as causas do TEA. Assim, podemos sugerir que há diversos fatores associados ao TEA, sendo um desafio encontrar grande número de indivíduos que compartilham das mesmas anormalidades gênicas relacionadas ao TEA, por isso a importância de se ampliar a quantidade de estudos com TEA e validar as ferramentas genômicas atuais para um efetivo diagnóstico para TEA.

9. CONCLUSÃO

- Foram observadas CNVs de ganho e de perda, pela técnica CMA, nos indivíduos com indicação clínica para TEA;
- Observamos um padrão de distribuição de CNVs para estes indivíduos destacando o envolvimento dos cromossomos 14, 15, 22 e X;
- Encontramos que os principais genes envolvidos nos pacientes por nós avaliados com TEA foram: *ST6GAL2*, *NUP155*, *WDR70*, *CHRNA7*, *TPPP*, *ZNF630*, *SSX6* e *SPACA5*;
- Foram aplicadas Entrevista Escala de Avaliação do Autismo na Infância (CARS) em todos indivíduos. Encontramos que os scores foram correspondentes aos achados de CNVs que favoreceram TEA;
- Foram aplicadas Entrevista Revisada de Diagnóstico de Autismo (ADI-R) em todos indivíduos. Encontramos que os scores não corresponderam aos achados de CNVs em dois probandos mais jovens, indicando possível viés de respostas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. ALESI V, BERTOLI M, BARRANO G, et al. **335.4 kb microduplication in chromosome band Xp11.2p11.3 associated with developmental delay, growth retardation, autistic disorder and dysmorphic features.** *Gene*. 2012 Sep 1;505(2):384-7. doi: 10.1016/j.gene.2012.05.031. Epub 2012 May 24.
2. ASANO E, CHUGANI DC, MUZIK O. **Autism in tuberous sclerosis complex is related to both cortical and subcortical dysfunction.** *Neurology*;57:1269–1277, 2001
3. ATLADOTTIR HO, PARNER ET, SCHENDEL D; et al. **Time trends in reported diagnoses of childhood neuropsychiatric disorders: a Danish cohort study.** *Arch Pediatr Adolesc Med*;161:193–198, 2007.
4. Bacchelli E, Battaglia A, Cameli C, et al. **Analysis of CHRNA7 rare variants in autism spectrum disorder susceptibility.** *Am J Med Genet A*. 2015.
5. BAIELI S, PAVONE L, MELI C; et al. **Autism and phenylketonuria.** *J Autism Dev Disord*;33:201–204, 2003.
6. BASS MP, MENOLD MM, WOLPERT CM, et al. **Genetic studies in autistic disorder and chromosome 15.** *Neurogenetics*;2:219–226, 2000.
7. BATTAGLIA A, DOCCINI V, BERNARDINI L; et al. **Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features.** *Eur J Paediatr Neurol*. May 24, 2013.
8. BERNIER, R., GOLZIO, C., XIONG, B.; et al.. **Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development.** *Cell* 158: 263-276, 2014.
9. BETANCUR, C. **Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting.** *Brain*, (2011) Res. 1380, 42–77
10. BITTEL, D.C.; KIBIRYEVA, N.; BUTLER, M.G. **Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral outcomes in Prader-Willi syndrome.** *Pediatrics* 2006, 118, e1276–e1283

11. BOLTON PF, DENNIS NR, BROWNE CE, et al. **The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders.** *Am J Med Genet.*;105:675–685, 2001
12. BONNET C¹, GRÉGOIRE MJ, BROCHET K, et al. **Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22-p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization.** *J Hum Genet.* 2006;51(9):815-21. Epub 2006 Aug 10.
13. BORGATTI R, PICCINELLI P, PASSONI D, et al. **Relationship between clinical and genetic features in "inverted duplicated chromosome 15" patients.** *Pediatr Neurol.*;24:111–116, 2001
14. BOYAR FZ, WHITNEY MM, LOSSIE AC, et al. **A family with a grandmaternally derived interstitial duplication of proximal 15q.** *Clin Genet.*;60:421–430, 2001
15. **BRENTANI H, DE PAULA CS, BORDINI D, et al.** Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and Treatment. *Rev. Bras. Psiquiatr.* vol.35 supl.1 São Paulo, 2013
16. Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, et al. **C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain.** *Genomics.* 2007 May;89(5):588-95. Epub 2007 Mar 6.
17. BUTLER MG, RAFI SK, MANZARDO AM. **Clinically relevant candidate and known genes for autism spectrum disorders (ASD) with representation on high resolution chromosome ideograms.** *O A Autism* 2014 Mar 25;2(1):5.
18. BUTLER, M.G.; FISCHER, W.; KIBIRYEVA, N; et al. **Array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis in Prader-Willi syndrome.** *Am. J. Med. Genet. A* 2008
19. CASAS KA, MONONEN TK, MIKAIL CN, et al. **Chromosome 2q terminal deletion: report of 6 new patients and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals.** *Am J Med Genet A.* Nov 1;130A(4):331-9, 2004.
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators; **Prevalence of autism spectrum disorders—Autism and Deve-**

- Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR* *Surveill Summ* 2009;58:1–20.**
21. CHAKRABARTI S, FOMBONNE E. **Pervasive developmental disorders in preschool children.** *JAMA*;285:3093–3099, 2001
 22. COE BP, GIRIRAJAN S, EICHLER EE. **The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease.** *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160C:118e29, 2012
 23. CONNOLLY JJ, HAKONARSON H. **The impact of genomics on pediatric research and medicine.** *Pediatrics*;129:1150e60, 2012
 24. COOK JR EH, SCHERER SW. **Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions.** *Nature*;455:919e23, 2008.
 25. Cox DM, Butler MG. **The 15q11.2 BP1-BP2 microdeletion syndrome: a review.** *Int J Mol Sci*. 2015 Feb 13;16(2):4068-82. doi: 10.3390/ijms16024068. Review.
 26. DE KOVEL CG, TRUCKS H, HELBIG I; et al. **Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies.** *Brain*;133:23e32, 2010.
 27. DELOREY TM, HANDFORTH A, ANAGNOSTARAS SG, et al. **Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome.** *J Neurosci*;18:8505–8514, 1998.
 28. DEVLIN B, SCHERER SW. **Genetic architecture in autism spectrum disorder.** *Curr Opin in Genet Dev*; 22:229–237 2012
 29. Di Benedetto D, Di Vita G, Romano C, et al. **6p22.3 deletion: report of a patient with autism, severe intellectual disability and electroencephalographic anomalies.** *J.Hum. Genet* 2013
 30. DSM-IV-TR. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: texto revisado.** *American Psychiatric Association*. Porto Alegre: Artmed; 2002.
 31. DUNCAN A, CHODIRKER B, BENOIT L; et al. **CCMG position statement: use of array genomic hybridization technology in constitutional genetic diagnosis in Canada.** *Ontario, Canada: Canadian College of Medical Geneticists*. Available at: 2009.

32. DYKENS E, VOLKMAR F. **Medical conditions associated with autism.** In: COHEN D, VOLKMAR F, eds. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders*. 2nd ed. New York, NY: Wiley; 1997:388–410
33. EL-FISHAWY P, STATE MW. **The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications.** *Psychiatr Clin North Am.*; 33:83–105, 2010.
34. EL-HATTAB AW¹, BOURNAT J, ENG PA, et al. **Microduplication of Xp11.23p11.3 with effects on cognition, behavior, and cranio facial development.** *Clin Genet.* 2011 Jun;79(6):531-8. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01496.x.
35. ELSABBAGH M, DIVAN G, KOH YJ, et al. **Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders.** *Autism Res* 2012 5(3):160–179. doi:10.1002/aur.239
36. ESTECIO M, FETT-CONTE AC, VARELLA-GARCIA M; et al. **Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders.** *J Autism Dev Disord.*;32:35–41, 2002.
37. FARLEY MA, MCMAHON WM, FOMBONNE E. **Twenty-year outcome for individuals with autism and average or near-average cognitive abilities.** *Autism Res* 2:109 –118, 2009.
38. FILIPEK PA, JURANEK J, SMITH M. **Mitochondrial dysfunction in autistic patients with 15q inverted duplication.** *Ann Neurol.*;53: 801–804, 2003.
39. FOLSTEIN SE, PIVEN J. **Etiology of autism: genetic influences.** *Pediatrics.*; 87:767–73, 1991.
40. FOLSTEIN SE, ROSEN-SHEIDLEY B. **Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder.** *Nat Rev Genet.*;2:943–955, 2001.
41. FOMBONNE E. **Epidemiological trends in rates of autism.** *Mol Psychiatry.*;7(suppl 2): S4–S6, 2002.
42. FOMBONNE E. **Epidemiology of pervasive developmental disorders.** *Pediatr Res.*; 65:591-8, 2009.
43. FOMBONNE E. **Past and future perspectives on autism epidemiology.** In: Moldin SO, Rubenstein JLR, editors. *Understanding autism: from basic neuroscience to treatment*. Boca Raton: CRC Press; p. 25-45, 2006.

44. FREITAG CM. **The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature.** *Mol Psychiatry*. 2007 Jan;12(1):2-22. Epub 2006 Oct 10.
45. FRIETZE S, O'GEEN H, BLAHNIK KR, et al. **ZNF274 recruits the histone methyltransferase SETDB1 to the 3' ends of ZNF genes.** *PLoS One*. 2010 Dec 8;5(12):e15082. doi: 10.1371/journal.pone.0015082.
46. FROYEN G, BAUTERS M, BOYLE J, et al. **Loss of SLC38A5 and FTSJ1 at Xp11.23 in three brothers with non-syndromic mental retardation due to a microdeletion in an unstable genomic region.** *Turner G. Hum Genet*. 2007 Jun;121(5):539-47. Epub 2007 Feb
47. GIRIRAJAN S, ROSENFELD JA, COOPER GM; et al. **A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay.** *Nat Genet*; 42:203e9, 2010.
48. GLESSNER JT, WANG K, CAI G; et al. **Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes.** *Nature*; 459:569e73, 2009
49. GOLZIO, C., WILLER, J., TALKOWSKI, M.E., et al.. **KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant.** *Nature*, (2012) 485, 363–367.
50. GURRIERI F, BATTAGLIA A, TORRISI L, et al. **Pervasive developmental disorder and epilepsy due to maternally derived duplication of 15q11-q13.** *Neurology*;52:1694–1697, 1999.
51. GUTHRIE W, SWINEFORD LB, NOTTKE C; et al. **Early diagnosis of autism spectrum disorders: stability and change in clinical diagnosis and symptom presentation.** *J Child Psychol Psychiatry*. Oct 9, 2012.
52. HAGE SRDV, GUERREIRO MM. **Distúrbio específico de linguagem: aspectos linguísticos e neurobiológicos.** In: FERNANDES FDM, MENDES BCA, NAVAS ALPGP, editors. *Tratado de fonoaudiologia*. 2nd ed. São Paulo: Roca; 2009. p. 323-9
53. HARTLEY, S.L.; MACLEAN, W.E., JR.; BUTLER, M.G; et al. **Maladaptive behaviors and risk factors among the genetic subtypes of Prader-Willi syndrome.** *Am. J. Med. Genet. A* 2005, 136, 140–145.
54. HARVARD C, MALENFANT P, KOOCHEK M.; et al. **A variant Cri du Chat phenotype and autism spectrum disorder in a subject with de novo cryptic mi-**

- crodeletions involving 5p15.2 and 3p24.3-25 detected using whole genomic array CGH.** *Clin Genet*, (2005) 67:341–351
55. HERZING LB, COOK EH JR, LEDBETTER DH. **Allele-specific expression. analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression. of UBE3A and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications.** *Hum Mol Genet.*;11:1707–1718, 2002.
 56. HERZING LB, KIM SJ, COOK EH JR; et al. **The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression.** *Am J Hum Genet.*;68:1501–1505, 2001.
 57. HONG SE, SHUGART YY, HUANG DT, et al. **Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations.** *Nat Genet.*;26:93–96, 2000.
 58. HUNTSMAN MM, PORCELLO DM, HOMANICS GE; et al. **Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus.** *Science.*;283:541–543, 1999.
 59. JENNIFER L. ROBERTSA, KARINE HOVANESB, MAJED DASOUKIC; et al. **Chromosomal Microarray Analysis of Consecutive Individuals with Autism Spectrum Disorders or Learning Disability Presenting for Genetic.** *Gene*. 2014 Feb 1;535(1):70-8. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.020. Epub Nov 2, 2013.
 60. JUDITH H. MILES. **Autism spectrum disorders.** *A genetics review*; 41:1738, 2011.
 61. KLEEFSTRA T, YNTEMA HG, OUDAKKER AR, et al. **Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation.** *J Med Genet.* 2004 May;41(5):394-9. No abstract available.
 62. KLIN A. **Autism and Asperger syndrome: an overview.** *Rev Bras Psiquiatr.*; 28:s3-11, 2006.
 63. KUMAR RA, KARAMOHAMED S, SUDI J; et al. **Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism.** *Hum Mol Genet*; 17:628e38, 2008.
 64. Kusenda M, Vacic V, Malhotra D, et al. **The Influence of Microdeletions and Microduplications of 16p11.2 on Global Transcription Profiles.** *J Child Neurol.* 2015 Dec;30(14):1947-53. doi: 10.1177/0883073815602066. Epub 2015 Sep

65. LAI CS, FISHER SE, HURST JA, et al. **The SPCH1 region on human 7q31:genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder.** *Am J Hum Genet.*;67:357–368, 2000.
66. LAI CS, FISHER SE, HURST JA; et al. **A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder.** *Nature.*;413:519–523, 2001
67. LAURITSEN M, MORS O, MORTENSEN PB, EWALD H. *J Child Psychol Psychiatry.* 1999 Mar;40(3):335-45. Review. Infantile autism and associated autosomal chromosome abnormalities: a register-based study and a literature survey.
68. LEBLOND CS, HEINRICH J, DELORME R; et al. **Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders.** *PloS Genet*; 8:e1002521, 2012.
69. LEHOUX S, GROUX-DEGROOTE S, CAZET A, et al..**Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells.** *J Epub* 2009 Sep 2010
70. LEVY D, RONEMUS M, YAMROM B; et al. **Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders.** *Neuron*, 2011; 70: 886–897.
71. LORD C, SHULMAN C, DILAVORE P. **Regression and word loss in autistic spectrum disorders.** *J Child Psychol Psychiatry.*;45:936-55, 2004.
72. LUGTENBERG D, YNTEMA HG, BANNING MJ, et al.**ZNF674: a new kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation.** *Am J Hum Genet.* 2006 Feb;78(2):265-78. Epub 2005 Dec 29.
73. MARTIN ER, MENOLD MM, WOLPERT CM, et al. **Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric a receptor subunit genes in autistic disorder.** *Am J Med Genet.*;96:43–48, 2000.
74. MASUREL-PAULET A, ANDRIEUX J, CALLIER P, et al. **Delineation of 15q13.3 microdeletions.** *Clin Genet.* 2010
75. MCDUGLE CJ, POSEY D. **Genetics of childhood disorders: XLIV. autism, part 3: psychopharmacology of autism.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*;41:1380–1383, 2002.

76. Menashe I¹, Grange P, Larsen EC, Banerjee-Basu S, Mitra PP. **Co-expression profiling of autism genes in the mouse brain.** *PLoS Comput Biol.* 2013;9(7):e1003128. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003128. Epub 2013 Jul 25.
77. MESSINGER D, YOUNG GS, OZONOFF S; et al. **Beyond autism: a baby siblings research consortium study of high-risk children at three years of age.** *J Am Acad Child Adoles Psych.*; 52:300–308, 2013.
78. MILLER DT, ADAM MP, ARADHYA S; et al. **Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.** *Am J Hum Genet*;86:749e64, 2010.
79. MILNER, K.M.; CRAIG, E.E.; THOMPSON, R.J; et al. **Prader-Willi syndrome: Intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype.** *J. Child Psychol. Psychiatry* 2005, 46, 1089–1096.
80. MITRA I, TSANG K, LADD-ACOSTA C, et al. **Pleiotropic Mechanisms Indicated for Sex Differences in Autism.** *PLoS Genet.* 2016 Nov 15;12(11):e1006425. doi: 10.1371/journal.pgen.1006425. eCollection 2016 Nov.
81. MONACO AP, BAILEY AJ. **Autism. The search for susceptibility genes.** *Lancet*;358(suppl):S3, 2001
82. MOREIRA DP, GRIESI-OLIVEIRA K, BOSSOLANI-MARTINS AL, et al. **Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy.** *PLoS One.* 2014 Sep 25;9(9):e107705. doi: 10.1371/journal.pone.0107705. eCollection 2014.
83. MUKADDES NM, HERGUNER S. **Autistic disorder and 22q11.2 duplication.** *World J Biol Psychiatry*, 2007; 8: 127–30.
84. NEALEBM, KOUY, LIU L, MAA`YAN A; et al.. **Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders.** *Nature*; 2012.485:242–245.
85. NEWBURY DF, BONORA E, LAMB JA, et al. **FOXP2 is not a major susceptibility gene for autism or specific language impairment.** *Am J Hum Genet.*;70:1318–1327, 2002.

86. Newbury, D. F., Warburton, P. C., Wilson, et al. **Mapping of partially overlapping de novo deletions across an autism susceptibility region (AUTS5) in two unrelated individuals affected by developmental delays with communication impairment.** *Am. J. Med. Genet.* 149A: 588-597, 2009.
87. NOOR A, WHIBLEY A, MARSHALL CR; et al. **Phenotypic spectrum associated with duplication of Xp11.2211.23 includes Autism Spectrum Disorder.** *Eur J Med Genet*; 2011.
88. NURMI EL, BRADFORD Y, CHEN Y, et al. **Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families.** *Genomics.*; 77:105–113, 2001.
89. O'ROAK BJ, VIVES L, FU W; et al.. **Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders.** *Science*; 2012
90. OWENS DF, KRIEGSTEIN AR. **Is there more to GABA than synaptic inhibition?** *Nat Rev Neurosci.*;3:715–727, 2002
91. OZONOFF S, IOSIF AM, BAGUIO F; et al. **A prospective study of the emergence of early behavioral signs of autism.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*;49:256-66, 2010.
92. PAGE T, COLEMAN M. **Purine metabolism abnormalities in a hyperuricosuric subclass of autism.** *Biochim Biophys Acta.*;1500:291–296, 2000.
93. PAUL R, CHAWARSKA K, FOWLER C; et al. **“Listen my children and you shall hear”: auditory preferences in toddlers with autism spectrum disorders.** *J Speech Lang Hear Res*;50:1350-64, 2007.
94. PAUL R. **Autism spectrum disorders in infants and toddlers: diagnosis, assessment and treatment.** New York: *Guilford Press*; p. 76-103, 2008
95. PAULA CS, RIBEIRO SH, FOMBONNE E; et al. **Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study.** *J Autism Dev Disord.*;41:1738-42, 2011
96. PER TL, BAUMAN ML. **Neuropathology of infantile autism.** *Mol Psychiatry*;7(suppl 2): S12–S13, 2002

97. PERSICO AM, D'AGRUMA L, MAIORANO N, et al. **Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder.** *Mol Psychiatry*.;6:150–159, 2001.
98. PETEK E, WINDPASSINGER C, VINCENT JB, et al. **Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome.** *Am J Hum Genet*.;68:848–858, 2001
99. PICKETT E, PULLARA O, O'GRADY J; et al. **Speech acquisition in older nonverbal individuals with autism: a review of features, methods, and prognosis.** *Cogn Behav Neurol*.; 22:1-21, 2009.
100. PITON, J. L. MICHAUD, H. PENG, S; et al. **Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism.** *Hum. Mol. Genet.* 17, 3965–3974 (2008).
101. PUJANA, M.A.; NADAL, M.; GUITART, M; et al. **Human Chromosome 15q11–q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons.** *Eur. J.Hum. Genet.* 2002, 10, 26–35.
102. QIAO Y, LIU X, HARVARD C, et al. **Autism-associated familial microdeletion of Xp11.22.** *Clin Genet.* 2008 Aug;74(2):134-44. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01028.x. Epub 2008 May 21
103. Ramelli GP, Silacci C, Ferrarini A, et al.. **Microduplication 22q11.2 in a child with autism spectrum disorder: clinical and genetic study.** *Dev Med Child Neurol.* 2008 Dec;50(12):953-5. doi: 10.1111/j.1469-8749.2008.03048.x
104. REBECCA MUHLE, STEPHANIE V. TRENTACOSTE; et al. **The Genetics of Autism Pediatrics**.;113:e472, 2004.
105. REDON R, ISHIKAWA S, FITCH KR; et al. **Global variation in copy number in the human genome.** *Nature*; 444:444e54, 2006
106. RINEER S, FINUCANE B, SIMON EW. **Autistic symptoms among children and young adults with isodicentric chromosome 15.** *Am J Med Genet*.;81:428–433, 1998.
107. ROGERS SJ, WEHNER DE, HAGERMAN R. **The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome,**

- idiopathic autism, and other developmental disorders.** *J Dev Behav Pediatr*;22:409–417, 2001.
108. RUTTER M. **Genetic studies of autism: from the 1970s into the millennium.** *J Abnorm Child Psychol*;28:3–14, 2000.
 109. S. S. BHAT, S. LADD, F. GRASS; et al. **Disruption of the IL1RAPL1 gene associated with a pericentromeric inversion of the X chromosome in a patient with mental retardation and autism.** *Clin. Genet.* 73, 94–96 (2008).
 110. SAHOO, T.; BACINO, C.A.; GERMAN, J.R.; et al. **Identification of novel deletions of 15q11q13 in Angelman syndrome by array-CGH: Molecular characterization and genotype-phenotype correlations.** *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, 15, 943–949.
 111. SANDERS SJ, HE X, WILLSEY AJ, et al **Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci.** *Neuron.* 2015 Sep 23;87(6):1215-33. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.016.
 112. SCHAEFER GB, MENDELSON NJ. **Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders.** *Genet Med*;10:301–305, 2008.
 113. SCHAEFER GB, STARR L, PICKERING D; et al. **Array comparative genomic hybridization findings in a cohort referred for an autism evaluation.** *J Child Neurol*; 25:1498–1503, 2010.
 114. SCHERER SW, CHEUNG J, MACDONALD JR, et al. **Human chromosome 7: DNA sequence and biology.** *Science*;300:767–772, 2003
 115. SCHROER RJ, PHELAN MC, MICHAELIS RC; et al. **Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q.** *Am J Med Genet*; 76:327–336, 1998.
 116. SEBAT J, LAKSHMI B, MALHOTRA D; et al. **Strong association of de novo copy number mutations with autism.** *Science*; 316:445e9, 2007.
 117. SEBAT J, LAKSHMI B, TROGE J; et al. **Large-scale copy number polymorphism in the human genome.** *Science*;305:525e8, 2004.

118. SHEN Y, DIES KA, HOLM IA; et al. **Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders.** *Pediatrics*; 125:e727e35, 2010
119. Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, et al. **Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation.** *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1341-54. Epub 2003 Nov 18.
120. STANKIEWICZ P, LUPSKI JR. **Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.** *Trends Genet*; 18:74e82, 2002.
121. SUN J, BUYS N. **Early executive function deficit in preterm children and its association with neurodevelopmental disorders in childhood: a literature review.** *Int J Adolesc Med Health.*;24:291-9, 2012.
122. SUTCLIFFE JS, NURMI EL, LOMBROSO PJ. **Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosome 15q11-q13 genes in autism.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*;42:253–256, 2003
123. TAGER-FLUSBERG H, PAUL R, LORD C: **Language And Communication In Autism.** IN:VOLKMAR F, PAUL R, KLIN A, COHEN D, editors. **Handbook of autism and pervasive developmental disorders, assessment, interventions, and policy.** 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons;. p. 335-64, 2005.
124. TAYLOR B.. **Vaccines and the changing epidemiology of autism.** *Child Care Health Dev.* 2006 Sep;32(5):511-9. Review
125. TUTAR Y. **Pseudogenes.** *Comp Funct Genomics.* 2012;2012:424526. doi:10.1155/2012/424526. Epub 2012 May 7.
126. VAN AMEN-HELLEBREKERS CJ, JANSEN S, PFUNDT R, et al. **Duplications of SLC1A3: Associated with ADHD and autism.** *Eur J Med Genet.* 2016 Aug;59(8):373-6.
127. VARELA, M.C.; KOK, F.; SETIAN, N; et al. **Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: Study of 75 patients.** *Clin. Genet.* 2005, 67, 47–52
128. VINCENT JB, HERBRICK JA, GURLING HM, et al. **Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual.** *Am J Hum Genet.*;67:510–514, 2000

129. VORSTMAN JA, STAAL WG, VAN DAALEN E, et al. **Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism.** *Mol Psychiatry*. 2006 Jan;11(1):1, 18-28. Review.
130. WANG M, ZHANG S, HUANG QY, YI CHUAN. **Computational biology strategy for identification of complex disease genes.** *Chinese* 2009 Jun;31(6):581-6..
131. Weder N¹, Zhang H², Jensen K², et al. **Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Apr;53(4):417-24.e5. doi: 10.1016/j.jaac.2013.12.025. Epub 2014 Jan 27.
132. WEISS LA, SHEN Y, KORN JM; et al. **Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism.** *N Engl J Med*;358:667e75, 2008.
133. WOLPERT CM, DONNELLY SL, CUCCARO ML, et al. **De novo partial duplication of chromosome 7p in a male with autistic disorder.** *Am J Med Genet.*;105:222–225, 2001.
134. XU J, ZWAIGENBAUM L, SZATMARI P; et al. **Molecular cytogenetics of autism.** *Curr Genomics*; 5:347e64, 2004
135. YAN WL, GUAN XY, GREEN ED, et al. **Childhood-onset schizophrenia/autistic disorder and t(1;7) reciprocal translocation: identification of a BAC contig spanning the translocation breakpoint at 7q21.** *Am J Med Genet.*;96:749–753, 2000.

Molecular Characterization of Koolen De Vries Syndrome in Two Girls with Idiopathic Intellectual Disability from Central Brazil

Gustavo R. Nascimento^{a, b} Irene P. Pinto^{a, c} Aldaires V. de Melo^{a, c}
Damiana M. da Cruz^a Cristiano L. Ribeiro^{a, c} Claudio C. da Silva^{a–c}
Aparecido D. da Cruz^{a–c} Lysa B. Minasi^{a, b}

^aDepartamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon, and ^bPrograma de Pós-Graduação em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, and ^cPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

Established Facts

- Koolen-De Vries syndrome is a rare genetic condition caused by 17q21.31 microdeletion including the *KANSL1* and *MAPT* genes.
- The main clinical features are developmental delay, facial dysmorphism, and friendly behavior. The phenotype may vary comprising cryptorchidism, scoliosis, kidney and urologic anomalies as well as epilepsy.

Novel Insights

- Our patients are 2 of 3 cases identified with a 17q21.31 microdeletion in Brazil and present with major features observed in Koolen De Vries syndrome. We believe that it is important to investigate rare syndromic disorders and try to identify the genetic causes of intellectual disability and that rare diseases demand to be published to make cases available for future studies.
- Chromosomal microarray analysis is an effective method to establish adequate genomic diagnosis of idiopathic intellectual disability providing appropriate biological information which could be beneficial for patients and medical management.

Keywords

Chromosomal microarray analysis · Copy number variation · Microdeletion 17q21.31

Abstract

Koolen de Vries syndrome (KDVS; MIM 610443) is a genomic disorder caused by a recurrent microdeletion derived from nonallelic homologous recombination mediated by flanking

segmental duplications. Clinical manifestations of this syndrome are characterized by intellectual disability, hypotonia, a friendly behavior, distinctive facial features, and epilepsy. Herein, we report a case of 2 girls who revealed global developmental delay, mild facial dysmorphisms, friendly behavior, and epileptic seizure with a de novo 17q21.31 microdeletion detected by chromosomal microarray analysis (CMA). Conventional cytogenetics analysis by GTG-banding showed a female karyotype 46,XX for both girls. CMA revealed a mi-

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/msy

© 2017 S. Karger AG, Basel
1661–8769/17/0000–0000\$39.50/0

Irene P. Pinto
Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Rua 235, n. 40, Bloco L, Área IV Setor Universitário
Goiânia, GO 74605-010 (Brazil)
E-Mail ipiazapinto@gmail.com

crodeletion spanning approximately 500 kb in 17q21.31 in both girls, encompassing the following genes: *CRHR1*, *MGC57346*, *CRHR1-IT1*, *MAPT-AS1*, *SPPL2C*, *MAPT*, *MAPT-IT1*, *STH*, and *KANSL1*. Haploinsufficiency of one or more of these genes within the deleted region is the most probable cause of the probands' phenotype and is responsible for the phenotype seen in KDVS. CMA is a powerful diagnostic tool and an effective method to identify the de novo 17q21.31 microdeletion associated with KDVS in our probands.

© 2017 S. Karger AG, Basel

Koolen de Vries syndrome (KDVS; MIM610443), also known as 17q21.31 microdeletion syndrome, is a genomic disorder defined by peculiar facial features, including a bulbous nasal tip, global developmental delay, moderate to severe intellectual disability, hypotonia, and friendly behavior [Koolen et al., 2006, 2008]. In addition, other phenotypic features were observed including scoliosis/kypnosis in 36% of the patients with this microdeletion, cryptorchidism (78%), kidney and urological anomalies (32%), as well as epilepsy described in more than 55% of the individuals [Bernardo et al., 2016]. The prevalence of KDVS varies from 1 in 13,000 and 1 in 20,000, identified as a de novo event [Egger et al., 2013]. This syndrome is caused by a recurrent microdeletion with sizes ranging from 500 to 650 kb at 17q21.31, derived from nonallelic homologous recombination (NAHR) mediated by flanking segmental duplications [Koolen et al., 2006, 2012]. The recurrent 17q21.31 microdeletion encompasses 5 genes *CRHR1*, *KANSL1*, *MAPT*, *SPPL2C*, and *STH* [Koolen et al., 2012; Egloff et al., 2014; Barone et al., 2015]. Additionally, point mutations in *KANSL1* and *MAPT* cause the haploinsufficiency in these genes and were associated with the KDVS phenotype [Koolen et al., 2008, 2012; Zol-lino et al., 2012].

Herein, we report a case of 2 girls who presented with global developmental delay, mild facial dysmorphisms, friendly behavior, and epileptic seizure with a de novo 17q21.31 microdeletion detected by chromosomal microarray analysis (CMA).

Case Reports

Patient 1

The proband, an 18-year-old female and the second child of nonconsanguineous parents, was born at 38 weeks' gestation to a 22-year-old mother and 26-year-old father by cesarean section. Her birth weight and size were 2,550 g and 45 cm, respectively. Her head circumference was 33 cm. She presented with epilepsy. The

seizure episodes began in early infancy. Talking started at 3 years of age. Physical examination of the proband revealed global developmental delay, mild intellectual disability, and friendly behavior. She also had mild facial dysmorphisms, such as low-set ears, lop/cupped ears, a long face, and a tubular or 'pear-shaped' nose with a bulbous nasal tip. Her family history was unremarkable (Fig. 1a).

Patient 2

The proband, a 22-year-old girl, was born to nonconsanguineous parents at 42 weeks' gestation to a 32-year-old mother and 48-year-old father. At birth, her weight was 2,770 g and her crown-heel length was 47 cm. Her head circumference was 60 cm. The child was delivered by cesarean section. She was born with a club-foot, muscle weakness, and hypotonia. At 7 months, she manifested epilepsy. At physical examination, the patient revealed global developmental delay with cognitive and speech delay. Her facial dysmorphisms included a long face, lop/cupped ears, and a bulbous nose. The family history had no remarkable information (Fig. 1a).

Material and Methods

Karyotyping at >550-band resolution was carried out with peripheral blood samples from the patients using conventional cell culture, harvesting, and GTG-banding following standard procedures. Chromosomal analyses were done using the IKAROS® software (Metasystems Corporation, Germany).

Genomic DNA was isolated from whole blood using QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Germany). CMAs were performed for both patients and their parents using GeneChip® CytoScanHD™ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The array was designed specifically for cytogenetic research, including approximately 2,696,550 CNV markers, 743,304 SNP markers, and >1,953,246 non-polymorphic markers. CEL files obtained by scanning the arrays were analyzed using the Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix). The CNVs found in the 2 patients and their parents were compared with genomic variants in public databases, including DGV, DECIPHER, OMIM, and CytoScanHD™ Array Database.

17q21.31 Low-Copy Repeat Structure Analysis

Using the Segmental Duplication track (<http://genome.ucsc.edu/>) from the genome browser (Human Genome Build 37.1), we performed an analysis of duplicated genomic sequences including known low-copy repeats (LCRs) (segmental duplication >1 kb of non-RepeatMasked sequence with over 98% similarity), comparing an approximately 1.69-Mb region surrounding the proximal 17q21.31 locus (chr17:43,085,534–44,776,171). This region represented 3 times of the CNV size.

Results

Karyotyping showed no visible numerical or structural alterations in the chromosomes. Both girls showed female karyotypes (46,XX). CMA revealed a de novo microdeletion in both girls spanning approximately 500 kb

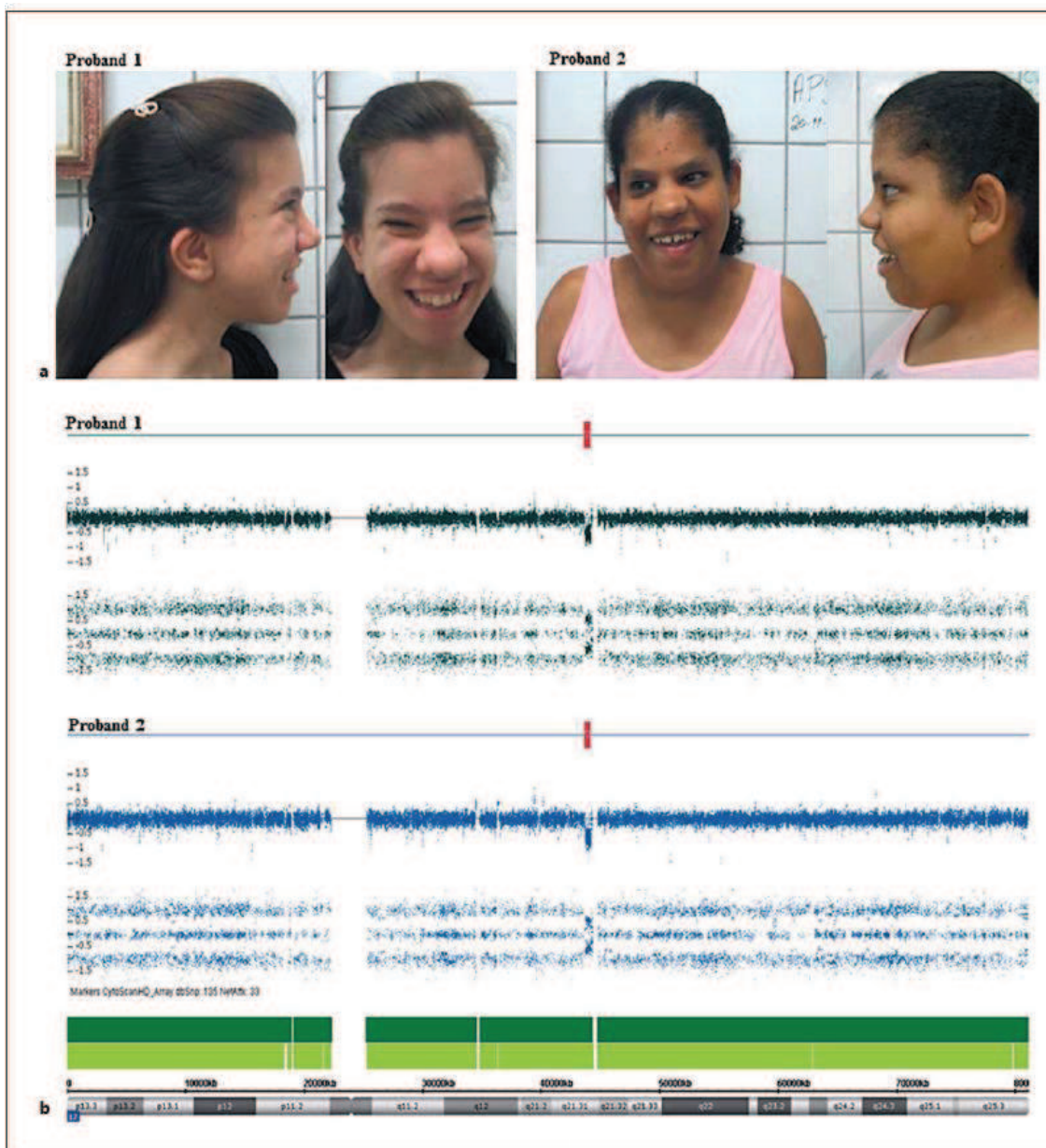


Fig. 1. Phenotype and molecular features of the 2 probands with KDVS. **a** Proband 1: facial dysmorphisms such as low-set ears, long face, a bulbous nasal tip are shown. Proband 2: dysmorphic features including a long face, lop/cupped ears, and a bulbous nose are shown. **b** CMA of the 17q21.31 microdeletion. CMA data from proband 1 and proband 2 showing a de novo 0.56-Mb and 0.51-Mb microdeletion, respectively, indicated by red blocks.

Case	Clinical features	Age, years	Karyotype	CNV Band	Size	Microarray nomenclature	Genes	Origin	LCR classification	start/end	identity	position size
1	GDD, FD, FB	18	46,XX	loss	17q21.31	0.56 Mb	17q21.31 (43648662_44212416)×1	de novo	19A (chr17:44407071) 19B (chr17:43573201)	44,407,071–44,424,507 43,573,201–43,593,494	98.17%	direct ~19,000 bp
2	GDD, FD, FB	22	46,XX	loss	17q21.31	0.51 Mb	17q21.31 (45703801_44212416)×1	de novo	19C (chr17:44624933) 19D (chr17:45573201)	44,624,933–44,642,442 43,573,201–43,593,494	98.23%	direct ~19,000 bp
FD, friendly behavior; FD, facial dysmorphism; GDD, global developmental delay; LCR, low-copy repeat.												

in 17q21.31, encompassing the following genes: *CRHR1*, *MGC57346*, *CRHR1-IT1*, *MAPT-AS1*, *SPPL2C*, *MAPT*, *MAPT-IT1*, *STH*, and *KANSL1* (Fig. 1b; Table 1). Parental CMA analysis confirmed the deletions to be de novo events.

Analyses of the rearranged 17q21.31 chromosomal region showed 2 major LCR families within the studied region. Each LCR family was named as 19A–19B and 19C–19D with approximately 19 kb flanking the disease locus. The LCRs were directly repeated and shared 98.2% identity (Fig. 2; Table 1).

Discussion

Intellectual disability is the most common developmental disorder, affecting 2–3% of the general population [Bernardini et al., 2010]. The frequency would probably be higher, if appropriate genetic testing and diagnostic procedures would be employed. According to Qiao et al. [2014], submicroscopic CNVs occur in 5–15% of the cases with intellectual disability. Thus, screening for submicroscopic chromosomal rearrangements using genomic microarrays in clinical practice have improved the diagnostic yield up to 10–25% in patients with intellectual disability [Battaglia et al., 2013].

Here, we report the cases of 2 girls presenting with several phenotypic traits commonly seen in KDVS, such as intellectual disability, dysmorphic facial features, friendly behavior, epilepsy, and a de novo 17q21.31 microdeletion harboring the genes *KANSL1*, *CRHR1*, and *MAPT* – characterized as the main genes associated with the syndrome.

Molecular mechanisms such as NAHR flanked by segmental duplications may collaborate to the formation of chromosomal rearrangements, leading to deleted or duplicated genomic segments. This finding demonstrates the importance of genomic instability in the recurrence of genomic disorders [Vlchova et al., 2014]. NAHR-mediated deletion has been observed as a potential mechanism in a considerable number of microdeletion syndromes, including the 17q21.31 microdeletion [Koolen et al., 2006]. We identified 2 major LCR families flanking the genomic rearrangement of 17q21.31 microdeletions. These findings show that LCRs may contribute to the increase in the susceptibility of CNV formation by NAHR, generating recurrent deletions in the 17q21.31 region.

The *KANSL1* gene, a member of a histone acetyltransferase complex, encodes a nuclear protein which acts as a subunit of 2 protein complexes involved in histone acetylation, especially the H4 subunit. This gene is expressed

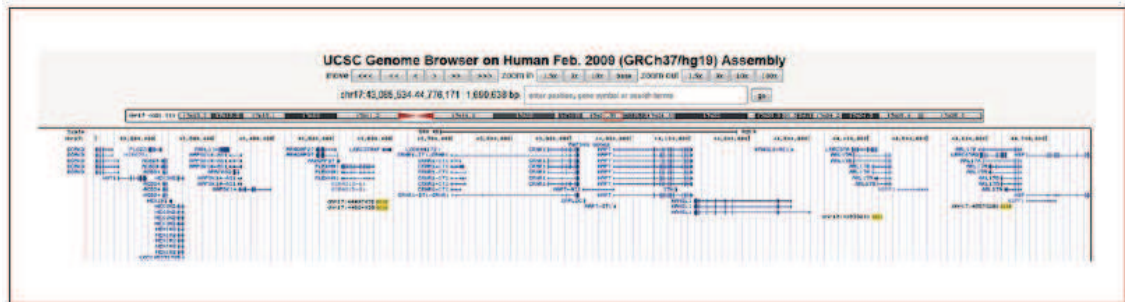


Fig. 2. Schematic representation of the 17q21.31 chromosomal region and summary of segmental duplication analyses. Two major LCR families [19A (chr17:44407071), 19B (chr17:43573201), 19C (chr17:44624933), and 19D (chr17:43573201)] in this region are represented by yellow blocks. Genes within this region are represented by blue lines.

in human tissues, including the central nervous system [Moreno-Igoa et al., 2015]. The haploinsufficiency of the *KANSL1* gene is sufficient to cause a KDVS phenotype. Koolen et al. [2012] and Zollino et al. [2012] detected a de novo point mutation in *KANSL1* in patients with failure to thrive in infancy, hypotonia, developmental delay with mild to moderate intellectual disability, and dysmorphic facial features.

The encoded microtubule-associated protein Tau (MAPT) is abundant in the axons of neurons and is highly expressed in the brain [Ballatore et al., 2007]. The Tau protein is a regulator of microtubule dynamics and plays a role in microtubule assembly and stabilization. This protein functions as an essential nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity under reactive oxygen species producing heat stress in primary neuronal cultures [Violet et al., 2014]. Besides, hyperphosphorylation and aggregation of the Tau protein leads to the formation of neurofibrillary tangles observed in neurodegenerative disorders (tauopathies) [Violet et al., 2014]. Mutations in the *MAPT* gene are involved in behavioral phenotypes and in certain neurodegenerative diseases [Koolen et al., 2008]. In addition, haploinsufficiency of the *MAPT* gene has been implicated in the neurocognitive functioning and has been associated with the main clinical features observed in individuals with 17q21.31 microdeletion [Koolen et al., 2006; Shaw-Smith et al., 2006; Wray, 2013].

The corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene (*CRHR1*) encodes a G protein-coupled receptor that binds neuropeptides of the corticotropin-releasing hormone family, which are major regulators of the hypothalamic-pituitary-adrenal pathway and mediate stress-in-

duced endocrine, behavioral, autonomic, and immune responses [Yang et al., 2015]. According to the authors, peculiar genes within the 17q21.31 microdeletion conferring some seizure susceptibility and the haploinsufficiency of the *CRHR1* gene may predispose to having seizures, especially infantile spasms [Wray, 2013; Bernardo et al., 2016]. Furthermore, *CRHR1* signaling is involved in memory and learning, and a dosage deficit of this gene may contribute to the presence of global developmental delay [Sharkey et al., 2009].

CMA analysis is a powerful diagnostic tool and it is an effective method to identify the 17q21.31 microdeletion associated with KDVS in our probands with idiopathic intellectual disability. To our knowledge, the cases reported here are similar to the first case of 17q21.31 microdeletion identified in Central Brazil [Dornelles-Wawruk et al., 2013], since CMA technology has been employed in the region, confirming its usefulness to increase the diagnostic yield of undiagnosed intellectual disability. The authors believe that further investigation is needed to allow adequate phenotypic classification of probands, especially in the event of undiagnosed rare genomic diseases. Although the phenotype found in our probands shows similar features of KDVS, only additional gene expression studies will confirm the association between these genes and KDVS. Thus, international collaborative studies will need to be designed and carried out to increase the likelihood of finding a large cohort of patients to validate the findings of individual studies. Notwithstanding, CMA is an efficient method to delineate phenotypic variations, allowing adequate clinical management and better follow-up of the probands and their families.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Rinaldo W. Pereira and the Rede ExeGenes for supporting the improvement of genetic diagnosis in Central Brazil. This work was sponsored by grants from CNPq (Edital 031/564465/2010-10) and FAPEG (2011.6002.19.1847.1134-03).

Statement of Ethics

This study was approved by the Institutional Ethics Committee. The family provided written informed consent.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ: Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663–672 (2007).
- Barone C, Novelli A, Capalbo A, Del Grano AC, Giuffrida MG, et al: An additional clinical sign of 17q21.31 microdeletion syndrome: preaxial polydactyly of hands with broad thumbs. *Am J Med Genet A* 167:1671–1673 (2015).
- Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, et al: Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol* 17:589–599 (2013).
- Bernardini L, Alesi V, Loddo S, Novelli A, Bottillo I, et al: High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *Eur J Hum Genet* 18:178–185 (2010).
- Bernardo P, Madia F, Santulli L, Del Gaudio L, Caccavale C, et al: 17q21.31 microdeletion syndrome: description of a case further contributing to the delineation of Koolen-de Vries syndrome. *Brain Dev* 38:663–668 (2016).
- Dornelles-Wawruk H, Pic-Taylor A, Rosenberg C, Krepischki AC, Safatle HP, et al: Complex phenotype associated with 17q21.31 microdeletion. *Mol Syndromol* 4:297–301 (2013).
- Egger JJ, Wingbermühle E, Verhoeven WM, Dijkman M, Radke S, et al: Hypersociability in the behavioral phenotype of 17q21.31 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* 161A:21–26 (2013).
- Egloff M, Encha-Razavi F, Garel C, Bonnière-Darcy M, Millischer AE, et al: 17q21.31 microdeletion: brain anomalies leading to prenatal diagnosis. *Cytogenet Genome Res* 144:178–182 (2014).
- Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, et al: A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 38:999–1001 (2006).
- Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA, Firth HV, Knight SJ, et al: Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 45:710–720 (2008).
- Koolen DA, Kramer JM, Neveling K, Nillesen WM, Moore-Barton HL, et al: Mutations in the chromatin modifier gene *KANSL1* cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet* 44:639–641 (2012).
- Moreno-Igoa M, Hernández-Charro B, Bengoa-Alonso A, Pérez-Juana-del-Casal A, Romero-Ibarra C, et al: *KANSL1* gene disruption associated with the full clinical spectrum of 17q21.31 microdeletion syndrome. *BMC Med Genet* 16:68 (2015).
- Qiao Y, Mercier E, Dastan J, Hurlburt J, McGilivray B, et al: Copy number variants (CNVs) analysis in a deeply phenotyped cohort of individuals with intellectual disability (ID). *BMC Med Genet* 15:82 (2014).
- Sharkey FH, Morrison N, Murray R, Iremonger J, Stephen J, et al: 17q21.31 microdeletion syndrome: further expanding the clinical phenotype. *Cytogenet Genome Res* 127:61–66 (2009).
- Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, et al: Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 38:1032–1037 (2006).
- Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, et al: A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci* 8:84 (2014).
- Vlckova M, Hancarova M, Drabova J, Slamova Z, Koudova M, et al: Monozygotic twins with 17q21.31 microdeletion syndrome. *Twin Res Hum Genet* 17:405–410 (2014).
- Wray C: 17q21.31 microdeletion associated with infantile spasms. *Eur J Med Genet* 56:59–61 (2013).
- Yang G, Zou LP, Wang J, Shi XY, Yang XF, et al: Association analysis of polymorphisms of the *CRHR1* gene with infantile spasms. *Mol Med Rep* 12:2539–2546 (2015).
- Zollino M, Orteschi D, Murdolo M, Lattante S, Battaglia D, et al: Mutations in *KANSL1* cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* 44:636–638 (2012).