

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE NEUROGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO**

MAYARA ANSELMINI

**RESULTADOS OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE PACIENTES
ESTUDADOS POR HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA
POR CHIPS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS (CGH *array*) EM SANTA
CATARINA:
ANÁLISE DOS FATORES: INDICAÇÃO, TAXA DIAGNÓSTICA E
APLICABILIDADE.**

FLORIANÓPOLIS

2013

MAYARA ANSELMÍ

**RESULTADOS OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE PACIENTES
ESTUDADOS POR HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA
POR CHIPS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS (CGH *array*) EM SANTA
CATARINA:
ANÁLISE DOS FATORES: INDICAÇÃO, TAXA DIAGNÓSTICA E
APLICABILIDADE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológica, área de concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica Francesca Maris.

Co-orientação: Msc. Ingrid Tremel Barbato

FLORIANÓPOLIS

2013

**Dedico esse trabalho à mamãe e papai,
Solange e Elair, tudo isso é para e por vocês.**

**À minha irmã Samara e ao meu
namorado Ricardo Filipe. Vocês são únicos
e insubstituíveis. Amo muito vocês!**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Angelica Francesca Maris, minha orientadora, pelo carinho, amizade, compreensão, valorosas observações e pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório. Foram de grande valia todos os conhecimentos transmitidos!

À Bióloga Msc. Ingrid Tremel Barbato, minha co-orientadora e amiga, obrigada pela disponibilidade e acolhimento desde o início de minha graduação. Como muitas vezes já te disse, és minha inspiração profissional. Obrigada pelo carinho, amizade, dedicação, pela confiança que sempre depositou em mim e pelo incentivo incessante.

À equipe do Laboratório de Genética Humana Neurogene pelo auxílio nas mais diversas etapas no desenvolvimento deste trabalho e de tantos outros, sempre muito solícitas e gentis. Meus sinceros agradecimentos por todas as ajudas, risadas e por ouvirem sempre minhas angústias. Admiro muito o trabalho de todas vocês!

À equipe do Laboratório de Neurogenética do Desenvolvimento da UFSC pelos auxílios e companheirismo.

Aos médico(a)s: Dr. Jorge Humberto Barbato Filho, Dra. Gisele Rozone de Luca, Dra. Pricila Bernardi, Dra. Louise Lapagesse de Camargo Pinto, Dr. Jaime Lin e Dra. Carla Marchesini, muito obrigada pela atenção e compreensão na abertura de suas atribuladas agendas e tarefas diárias para auxiliarem no preenchimento desses questionários.

Agradeço especialmente à minha banca: Dr. Jorge Humberto Barbato Filho e Dra. Gisele Rozone de Luca, meu agradecimento além do auxílio com os questionários pelo incentivo e disponibilidade na participação desse processo tão importante para mim.

Ao Hospital Infantil Joana de Gusmão em extensão a todos os funcionários, médicos ou não, que contribuíram de alguma forma para a realização dessa pesquisa, em especial ao seu Comitê de Ética em Pesquisa pela compreensão e empenho na aprovação do meu projeto de pesquisa.

Ao Centro de Genoma Humano da USP e a toda equipe da pesquisadora Carla Rosenberg pelo suporte técnico e científico para o meu entendimento dessa nova metodologia.

À todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina que ao longo da graduação colaboraram significativamente para a minha formação profissional e pessoal, meus sinceros agradecimentos e admiração!

Aos pacientes e suas famílias que aceitaram participar desta pesquisa, sem o qual consentimento nada disso seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e as agências de financiamento que deram o suporte e respaldo econômico para que essa pesquisa fosse viável.

Em especial...

À Deus, por me iluminar, dar força e proteção em todos os momentos da minha jornada.

À mamãe e papai, Solange e Elair, meus maiores incentivadores, pelo amor incondicional, “paitrocínios”, dedicação *full time* a esse ofício e por me deixarem como maior herança a minha educação, meus valores e princípios. “Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por vocês!”. À vocês, meus exemplos de perseverança e integridade, meu eterno agradecimento, amor e orgulho.

Ao meu namorado, Ricardo Fillipe, meu agradecimento pelo seu amor durante todos esses anos de universidade, pela compreensão com minhas ausências e *stress* durante essa fase. Obrigada pelos sorrisos espontâneos (enormes, diga-se passagem), abraços, paciência, incentivos e co-participação nesse processo que não se finda aqui. “*Well it's always better when we're together*”, conte sempre comigo assim como sei que posso contar com você. Lembre-se: *Winter is coming!*

À minha irmã Dodi, ou melhor, pequena Samara, pelo amor, pelas brigas (ou guerras!), e pela companhia em todos os momentos desde a infância que me fizeram refletir e melhorar como pessoa. Sempre estarei aqui para você, tentando ser seu exemplo, te amo muito.

À minha vovó Rosa, pelo amor, orações e apoio em sempre seguir em frente, não importando as adversidades. Obrigada pelo esforço ao tentar entender o que são os cromossomos, você foi brilhante!

À toda a minha família, Anselmi e de Cézaro, e a Riffel, que ganhei nesse tempo, pela convivência, por me apoiarem e acreditarem no meu potencial.

Aos meus amigos e amigas que compartilharam comigo as expectativas e angústias durante toda a graduação. Obrigada pelas parcerias, ajuda, festas, “bafões” e histórias que marcarão com saudades esse tempo.

Às minhas queridas revisoras Mariana e Carime, muito obrigada pelas ajudas e pela amizade. Vocês são muito especiais, desculpem eu dar tanto trabalho!

À Beatriz Pereira, nossa Bia e Jonathan W. Lawley, meu Aju: Obrigada infinitamente por toda a cumplicidade e amizade nesse tempo. Obrigada por me mostrarem sempre como ser uma pessoa melhor, certamente criamos laços que ultrapassam a barreira da universidade, somos amigos para a vida. Obrigada também à minha amiga desde sempre, Ana Caroline Gitrone, que mesmo de longe escutou meus desabafos e me deu conselhos. Amo vocês!

*“Hakuna Matata, é lindo dizer,
Hakuna Matata, sim vai entender.
Os seus problemas você deve esquecer,
isso é viver, é aprender, Hakuna Matata!”*

O Rei Leão

RESUMO

No Brasil, de acordo com o Censo 2010, 1,37% da população brasileira apresenta deficiência intelectual. Crianças que apresentam sinais de atraso do desenvolvimento neurológico ou transtornos nos primeiros anos de vida podem posteriormente ser diagnosticadas como portadoras de síndromes, deficiência intelectual ou autismo. As diretrizes atuais para esses pacientes recomendam avaliação citogenética olhando para certos tipos de anormalidades cromossômicas que poderiam ser relacionadas à estas condições. Essa avaliação usa como ferramenta o exame de cariótipo, onde utiliza microscópio de luz para a detecção das anomalias, perceptíveis com resolução acima de cerca de 10 Mb e sem informações precisas sobre os genes envolvidos nas dificuldades apresentadas pelo(a) paciente. Uma tecnologia mais recente, o CGH *array*, avalia o genoma como um todo e permite detectar anomalias cromossômicas não balanceadas (duplicações e deleções) bem como anormalidades no número de cromossomos com uma resolução muito maior, de até 500 pares de bases, que as antigas técnicas. O presente trabalho analisou uma amostra de 122 resultados de exames CGH *array* (via Laboratório de Genética Humana Neurogene, Florianópolis, Santa Catarina) no período de 5 anos. O número de resultados em que a investigação através do CGH *array* revelou alterações de provável casualidade na patogênese de pacientes foi de 30,32%. Essa porcentagem passa para 24,10%, quando são desconsiderados os pacientes que possuíam previamente cariótipo alterado. As principais indicações clínicas para execução do exame de CGH *array* foram: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (81,15%), dificuldade de aprendizado (72,95%) e características dismórficas (54,10% face e 26,23% membros). Quando os exames mostravam-se alterados as patologias que se destacaram foram: deficiência intelectual leve (46,42%), hiperatividade (46,15%), dismorfias de face (43,93%) e membros (43,75%) e dificuldade motora (40,47%). Houve diferenças nos resultados dos exames, onde pacientes em que ocorriam traços dismórficos ou sindrômicos marcantes obtiveram um maior número de alterações (43,93%) em relação aos sem dismorfias (14,28%). Este estudo mostrou um maior número de resultados de exame de CGH *array* alterados (30,32%) quando comparados com a literatura internacional (15-20%). A opção pelo CGH *array* como primeiro teste a ser usado, em detrimento especialmente ao cariótipo tradicional, é consenso por muitos grupos de estudos que investigam dismorfologias, malformações, deficiência intelectual idiopática (com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes), atraso no desenvolvimento, autismo, entre outros.

ABSTRACT

In Brazil, according to the Censo 2010, 1.37% of the population has intellectual disability. Children who show signs of developmental delay or neurological disorders early in life, can later be diagnosed as having syndromes, intellectual disabilities or autism. The current guidelines for these patients recommend cytogenetic evaluation in order to look for certain types of chromosomal abnormalities that may be causally related to their condition. This evaluation uses as a tool the karyotype examination, with light microscopy for detection of anomalies. Anomalies should be noticeable if alteration is higher than 10 Mb, and does not provide accurate information about the genes involved in the difficulties presented by patient. A more recent technology, the CGH *array*, also evaluates the genome as a whole and detects unbalanced chromosomal abnormalities (duplications and deletions) as well as abnormalities in chromosome number with a much higher resolution than old techniques, down to 500 base pairs. This study examined a sample of 122 test results using CGH *array* (through Laboratório de Genética Humana Neurogene, Florianópolis, Santa Catarina) over 5 years. Using the CGH *array* technique, 30.32% of the results, revealed alterations that could cause the pathogenesis of the patients. Considering only the patients with negative result for karyotype alterations. There are 24.10% altered CGH *array* exams when were exclude patients with a positive result that were included for presenting altered karyotyping. The main clinical indications for performing the examination with CGH *array* were developmental delay (81.15%), learning disabilities (72.95%) and dysmorphic features (54.10% on face and 26.23% on members) . When the results confirmed chromosome alterations, the prevalent disorders were: mild intellectual disability (46.42%), hyperactivity (46.15%), dysmorphic face (43.93%) and members (43.75%) and motor difficulty (40.47%). Patients that showed syndromic or dysmorphic features had a greater number of changes in the chromosomes (43.93%) when compared to those without dysmorphia (14.28%). This study showed a greater number of altered test results in CGH *array* analysis (30.32%) when compared to the literature (15-20%). The choice of using the CGH *array* before other tests, especially instead traditional karyotyping, is a consensus in many groups of studies investigating dysmorphology, congenital malformation, idiopathic intellectual disability (with or without dysmorphic or syndromic features), developmental delay and autism, among others.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos gerais da deficiência intelectual	11
1.2 Ferramentas diagnósticas	12
1.2.1 CGH <i>array</i> - <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>	13
1.2.2 Plataformas de CGH <i>array</i>	14
1.2.3 CNVs - <i>Copy Number Variations</i>	15
1.3 Outras aplicabilidades do CGH <i>array</i>	17
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS	20
4.1 Desenho amostral	20
4.2 Coleta de dados clínicos	20
4.3 Coleta das amostras	20
4.4 CGH <i>array</i>	21
4.5 Análise das taxas de resultados positivos e indicações clínicas	22
4.6 Análise dos dados	22
4.7 Considerações éticas	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	35
6.1 Características da Amostra	35
6.2 Principais indicações clínicas para solicitações do exame de CGH <i>array</i>	35
6.2.1 Porcentagem de exames de CGH <i>array</i> alterados	36
6.3 Principais indicações clínicas em exames de CGH <i>array</i> alterados	36
6.4 Comparações entre as principais indicações clínicas para as solicitações gerais do exame de CGH <i>array</i> e os exames de CGH <i>array</i> alterados	38
6.5 Principais indicações clínicas em exames de CGH <i>array</i> em pacientes com e sem traços dismórficos/sindrômicos	41
6.5.1 Porcentagem de exames de CGH <i>array</i> alterados em pacientes com e sem distúrbios	42
6.6 Principais achados clínicos em exames alterados de CGH <i>array</i>	43
6.7 CGH <i>array</i> e Cariótipo	47
6.8 CGH <i>array</i> como primeiro exame	48
6.9 Novas plataformas	48
6.10 Perspectivas	49
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO I	59
ANEXO II	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da deficiência intelectual

No Brasil, o Censo 2010 (IBGE, 2011) mostra que no país há 45.623.910 portadores de necessidades especiais dentre seus 190.755.799 habitantes, um percentual de 23,91% da população total. Destes, 2.617.025 apresentam deficiência intelectual, correspondendo a 1,37% da população brasileira. Normalmente essa deficiência revela-se antes dos dezoito anos, e para crianças com menos de cinco anos o diagnóstico é inconclusivo, pois não há parâmetros para mensurar o QI que sejam de confiança. Assim, para esses casos, adota-se o termo Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM) (SHAFFER, 2005).

No Brasil, o número de alunos que possuem deficiência intelectual e estão matriculados em escolas especiais ou regulares ultrapassa qualquer outro tipo de necessidade especial. Crianças que apresentam sinais de atraso no desenvolvimento neurológico nos primeiros anos de vida podem muitas vezes ser diagnosticadas com síndromes, deficiência intelectual ou autismo. Graves doenças, que em determinados casos estão associadas a anomalias genéticas, ao longo da vida apresentam desafios significativos para as famílias e para a saúde pública.

Segundo Xu e colaboradores (XU & CHEN, 2003), recentes estudos apontam que anomalias envolvendo cromossomos estão presentes nos exames de indivíduos com deficiência intelectual em porcentagens que variam entre 4% a 34,1%. Sabe-se ainda que mais da metade dos casos de deficiência intelectual são de causa desconhecida (idiopático) e muitas vezes abrangem rearranjos cromossômicos subteloméricos (B. B. A DE VRIES, WINTER, SCHINZEL, & VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, 2003). A alta densidade de genes presentes em regiões subteloméricas faz com que modificações na sequência do DNA se expressem em uma alteração fenotípica e comumente sejam observadas em pacientes com deficiência intelectual. De Vries e colaboradores (B. B. DE VRIES *et al.*, 2001; RAUCH *et al.*, 2004) afirmam que esses rearranjos explicam a causa de pelo menos 5% dos casos de deficiência intelectual idiopática e são constatados em casos de deficiência intelectual moderada em uma taxa de 7,4%.

A regra atual recomendada para crianças que apresentam esses sinais de atraso é a avaliação citogenética pesquisando certos tipos de anormalidades cromossômicas que podem ser causalmente relacionadas à sua condição.

1.2 Ferramentas diagnósticas

A citogenética humana teve seu início em 1882 com estudos de Fleming, mas somente na década de 60 Moorhead e colaboradores (MOORHEAD *et al.*, 1960) descreveram um dos protocolos mais utilizados até hoje na obtenção de metáfases com coloração através da Giemsa para posterior análise do cariótipo, o bandeamento G. A partir de então, a citogenética tradicional, fazendo uma análise individual, célula a célula, do conteúdo cromossômico, detectou muitas translocações, deleções e duplicações, e síndromes foram descobertas. A vantagem desse exame é que, para sua solicitação, o médico não precisa ter uma impressão diagnóstica de alguma síndrome ou desordem específica, basta apenas suspeitar de casualidade genética. Cerca de 10-20% dos casos de deficiência intelectual podem ser explicados por achados cariotípicos anormais, mas a porcentagem cai na pesquisa de síndromes, que não são identificadas na análise clínica, para 3% (DETH, 2012; MILLER *et al.*, 2010). O cariótipo analisado através da técnica utilizando microscópio de luz tem limitações na detecção de anomalias, sendo perceptíveis acima de cerca de 10 Mb e não havendo informações que identifiquem quais genes estariam associados às alterações encontradas. No cromossomo, o DNA está dez mil vezes mais condensado (mais curto) do que em sua sequência linear. Somado a isso, há o dispendioso cultivo celular, com células vivas, capazes de divisão celular. É trabalhoso, demorado, difícil e sujeito à má interpretação, exigindo pessoas altamente treinadas e especializadas para realizarem a análise (SOCIEDADE & GENÉTICA, 2011).

Métodos de citogenética molecular vieram primeiramente para serem complementares aos métodos de citogenética clássica. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) passou a ser usada em larga escala a partir dos anos 80, aonde veio para suprir as limitações da citogenética tradicional, permitindo o pareamento de determinados segmentos de DNA com sequências específicas de nucleotídeos complementares, possibilitando, assim, determinar regiões com maior especificidade (TRASK, 1991). Outra técnica que vem sendo utilizada é a *Multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA), que permite detectar microdeleções/duplicações com até 40 sequências de DNA, com base em reações de PCR

(SCHOUTEN *et al.*, 2002). As duas técnicas contribuíram na constatação de anormalidades cromossômicas estruturais inferiores ao limite de 10 Mb obtidas pelo cariótipo convencional. Em contrapartida, ao solicitar exame por FISH ou MLPA, a patologia já deve ser conhecida, assim como o local do genoma cuja alteração causa o problema – e exige um profissional com bons conhecimentos, em especial de dismorfologia, para solicitar o exame adequado. Com relação ao FISH, o número de sondas comerciais disponíveis para a realização do exame ainda é bem limitado.

1.2.1 CGH array - Array Comparative Genomic Hybridization

Em 1992, Kallioniemi e colaboradores (KALLIONIEMI *et al.*, 1992) descreveram a técnica da Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*), que originou outra técnica ainda mais aprimorada, a Hibridização Genômica Comparativa em microchip de DNA (*Array Comparative Genomic Hybridization*). Conhecida pela sigla *CGH array*, *microarray* ou *aCGH*, essa técnica avalia o genoma como um todo e permite detectar anomalias genômicas não balanceadas (microduplicações e microdeleções), bem como anormalidades no número de cromossomos, com uma resolução muito maior que as antigas técnicas. Este novo exame de citogenética molecular se funde com a genética molecular em seu sentido mais estrito no momento em que algumas plataformas que incorporam a análise de substituições de nucleotídeos simples (SNPs) em seus *chips* superam todas as limitações de resoluções dos antigos métodos (cariótipo, FISH e MLPA). Este método possibilita examinar no genoma, analisando nos segmentos cromossômicos de um indivíduo, se há perda ou ganho de DNA comparado a um genoma referência, regiões de dissomia uniparental e até polimorfismos de um único nucleotídeo (PINKEL *et al.*, 1998). Nos resultados dessa técnica encontram-se dados que revelam a região e o tamanho da alteração encontrada com bastante precisão. Os *softwares* utilizados permitem identificar se há genes envolvidos com a alteração, e quais genes são estes, através de uma correlação com a sequência do genoma humano.

Inicialmente o *CGH array* era empregado para esclarecer as alterações genéticas do câncer, sobretudo em tumores sólidos, identificando o aumento ou perda de segmentos cromossômicos no genoma (KALLIONIEMI *et al.*, 1992). Passou a elucidar anomalias que até então escapavam à identificação com os antigos métodos, entre elas algumas ligadas à deficiência intelectual, como deleções na região subtelomérica. Rapidamente o *CGH array*

tornou-se um método diagnóstico muitíssimo vantajoso para estudar a causa genética de distúrbios do desenvolvimento humano, solucionando casos idiopáticos de anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual (MILLER *et al.*, 2010).

Enquanto estudos na América do Norte e Europa descrevem uma taxa diagnóstica do exame CGH *array* de 15 a 20% dos pacientes, no Brasil os dados ainda são imprecisos, uma vez que não há publicações brasileiras sobre o assunto (MILLER *et al.*, 2010). O CGH *array* com BACs (sondas com cerca de 1 Mpb de tamanho) foi introduzida no IBUSP (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo), Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), em 2004, pela pesquisadora Carla Rosenberg. Na ocasião, a pesquisadora estudou aproximadamente 400 famílias com indivíduos afetados por deficiência intelectual e/ou anomalias congênitas, encontrando alterações cromossômicas entre 17% a 30% dos pacientes, taxas que variaram de acordo com o critério clínico de seleção (KREPISCHI-SANTOS *et al.*, 2006).

A quantidade de DNA necessária do paciente para a execução do exame através do CGH *array* confrontada com outras técnicas, acima descritas, é muito menor. Na técnica, o DNA teste (da amostra do paciente) e DNA controle (amostra referência) são marcados com fluorocromos cada um com cores diferentes (verde e vermelho, na maioria das vezes). Posteriormente, ambas as amostras são co-hibridizadas no chip (*array*) composto de sondas de DNA que abrangem o genoma como um todo. Com diferença nas intensidades das fluorescências das amostras pós hibridização é possível identificar alterações no número de cópias entre a amostra referência e a sujeita ao teste. O exame apresenta a desvantagem de não detectar rearranjos equilibrados (inserções, translocações e inversões) e ainda ser relativamente caro. Algumas vezes, outras técnicas moleculares (PCR, FISH e MLPA) ou mesmo a citogenética convencional, por exemplo, podem ser utilizadas no sentido de complementar e/ou confirmar uma alteração genômica encontrada (C. LEE, IAFRATE, & BROTHMAN, 2007).

1.2.2 Plataformas de CGH *array*

Na maioria das vezes, a técnica do CGH *array* usa diferentes plataformas de acordo com a quantidade de regiões pesquisadas. Elas podem variar basicamente de acordo com a resolução e o tipo das sondas que compõem o *array* (*chip*). A resolução é mensurada pelo

tamanho e o espaçamento entre uma sonda e outra. Já os tipos de sondas podem ser: BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) ou oligonucleotídeos, que são moléculas que contêm pares de bases fabricados exclusivos para sua utilização no *array*. As BACs são construídas a partir de sequências de cromossomos bacterianos artificiais e possuem uma resolução mais baixa quando comparadas às plataformas de oligonucleotídeos. Seus segmentos são relativamente grandes e variam entre 100-160KBs. Os *arrays* de oligonucleotídeos são compostos de segmentos menores de 50-100KBs, sendo capazes de detectar mais facilmente as perdas e ganhos de material genético e, portanto, possuindo uma maior capacidade diagnóstica, além de deterem uma maior cobertura do genoma.

As plataformas compostas por oligonucleotídeos possuem capacidade diagnóstica mais elevada (14,83%) que as compostas por BACs (9,76%), assegurando um diagnóstico mais eficaz e fornecendo mais elementos para um aconselhamento genético mais completo (CARLSON, HENRIKSON, VEENSTRA, & RAMSEY, 2005; ROGOWSKI, 2006). Entre as principais companhias que trabalham com as plataformas de oligonucleotídeos podemos citar: *Agilent*, *Affymetrix*, *NimbleGen* e *Illumina*. A plataforma *Human Genome CGH Microarray* de 44K e 60K, da empresa *Agilent*, foi a utilizada para executar os diagnósticos na amostra deste estudo. Vale a pena ressaltar que há um constante melhoramento na resolução das plataformas que tendem a um grau de definição cada vez maior conforme aumentam a densidade de sondas, acréscimo de SNPs e outros parâmetros importantes para a análise genômica.

1.2.3 CNVs - *Copy Number Variations*

Com a aplicabilidade da técnica do CGH *array*, a detecção nas variações no número de cópias, abreviadas como CNVs (*copy number variants*), aumentou tanto em pacientes com atraso no desenvolvimento e/ou anomalias congênitas como em indivíduos saudáveis. A dificuldade está na interpretação do significado clínico dessas variações no número de cópias. Segundo nomenclatura usada em uma revisão de Gijsbers e colaboradores (GIJSBERS *et al.*, 2011), as CNVs podem ser: benignas, potencialmente patogênicas ou conhecidamente patogênicas. Nesse sentido, muitas pesquisas estão sendo realizadas sobre o tema e vários fluxogramas de trabalho estão sendo propostos por laboratórios que fornecem diagnósticos

que incluem, por exemplo, consulta em bancos de dados (loais de pesquisa que ajudam a atribuir significados às CNVs).

As CNVs benignas são sem significado para o fenótipo do paciente. No genoma, certos genes podem apresentar dimensões variadas em seus segmentos de DNA e no número de repetições dos mesmos, apresentando um maior número de suas cópias em um quadro clínico normal. Possuem tamanho maior que 1 Kb, sendo verificadas em aproximadamente 6% do genoma humano, muitas vezes dificultando a interpretação dos resultados encontrados no CGH *array* (SHAIKH *et al.*, 2009). Critérios são desenvolvidos para classificá-las como benignas, entre eles, consultar o DGV (*Database of Genomic Variants - <http://projects.tcag.ca/variation/>*) que compila dados de artigos científicos onde CNVs foram encontradas apenas em indivíduos que eram usados em amostras controle (não possuíam doenças).

As CNVs potencialmente patogênicas possuem microdeleções e microduplicações que ainda não são relacionadas com síndromes bem descritas. Para correlacionar essas variações no número de cópias com fenótipos dos pacientes, alguns critérios são consultados e análises de informações que constam em bancos de dados são verificadas (BEJJANI & SHAFFER, 2008; C. LEE *et al.*, 2007). Para essa finalidade, são usados especialmente bancos de dados como: OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>*), ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays - <https://www.iscaconsortium.org/>*), DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>*). Neles é possível pesquisar se os resultados encontrados no do exame de CGH *array*, somados às características fenotípicas, já foram descritos (ou não) em qualquer parte do mundo, e ainda se são síndromes já bem validadas e conhecidas.

Visto que essas CNVs muitas vezes podem ser herdadas (99% quando se trata de submicroscópicas), é válido aplicar o teste aos pais biológicos, o que permite verificar se a alteração em questão foi herdada de um genitor assintomático (CHEUNG *et al.*, 2007). Se isto for o caso, é menos provável que a alteração seja a causa do problema apresentado pelo paciente. Mesmo assim, a técnica pode gerar resultados falso-positivos (alterações novas de aparente casualidade, porém sem ser a efetiva causa do fenótipo) ou falso-negativos, uma vez que certos polimorfismos podem ter efeito patogênico em determinados contextos genômicos (DARILEK *et al.*, 2008; C. LEE *et al.*, 2007).

As CNVs conhecidamente patogênicas são as que já estão correlacionadas nesses bancos de dados e na literatura com síndromes bem descritas, regiões que contêm genes associados às doenças e regiões subteloméricas (ricas em genes).

Um estudo associa que anomalias congênitas, microcefalia, baixa estatura e problemas cardíacos estão mais associados a crianças com CNVs patogênicas (SHOUKIER *et al.*, 2013). Outro estudo aponta que a interpretação das microduplicações é ainda mais difícil que das microdeleções (STANKIEWICZ, PURSLEY, & CHEUNG, 2010).

Assim, o contínuo refinamento das sequências do genoma, obtidas graças a uma resolução cada vez maior nas plataformas de CGH *array*, e a criação de bancos de dados com colaborações internacionais é um esforço efetivo na tentativa de explorar e atribuir significados a essa complexibilidade.

1.3 Outras aplicabilidades do CGH *array*

O CGH *array* vem sendo utilizado em outros campos de investigação da medicina, como no diagnóstico pré-implantacional e nos estudos de câncer. Depois de ser apontado como o primeiro método a ser usado em exames pós-natal, recentes estudos indicam que em breve o teste será útil também como primeiro exame na avaliação genética pré-natal ou implantacional (EVANGELIDOU *et al.*, 2013). Os resultados no exame de CGH *array* revelam-se mais promissores que os do cariótipo, tanto para avaliações pré-implantacionais que obtiveram cariótipo normal quanto para aqueles cujas alterações foram detectadas através de outros métodos. Nestes casos, o CGH *array* é sugerido para complementar a investigação (EVANGELIDOU *et al.*, 2013; LICHTENBELT, KNOERS, & SCHURING-BLOM, 2011). O CGH *array* permite ajudar na identificação de possíveis genes relacionados ao câncer, como subsídios para o entendimento de mecanismos e etiologia desse mal (CLIMENT, GARCIA, MAO, & ARSUAGA, 2007; MOHAPATRA, SHARMA, & YIP, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Devido a limitação de resolução do cariótipo (acima de 10Mb) para o diagnóstico das anomalias cromossômicas, considera-se importante compreender o exame de *CGH array* como uma nova tecnologia na aplicação dos testes genéticos. Sendo o *CGH array* um método que possibilita uma análise refinada de todo o genoma, esta tornou-se uma ferramenta de extremo interesse para a investigação de casos idiopáticos (de causa desconhecida) de distúrbios do desenvolvimento

Considerando o seu valor clínico, o presente trabalho pretende investigar como o *CGH array* tem auxiliado no diagnóstico e na identificação das bases moleculares em casos de autismo, deficiência intelectual idiopática e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, em Santa Catarina. Analisar também se a taxa diagnóstica dos exames solicitados no estado é semelhante ao relatado na literatura.

Assim, pretende-se que através do estudo de avaliação da indicação clínica, taxa diagnóstica e aplicabilidade do exame de *CGH array*, possa-se colaborar para a intensificação de pesquisas sobre o tema e para que novas diretrizes de saúde pública sejam consideradas, uma vez que, até o momento, o exame apresenta um alto custo para os pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterização de uma amostra de 122 resultados de exame de CGH *array* realizados através do Laboratório Neurogene, solicitados por médicos do Estado de Santa Catarina, no período de 5 anos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os resultados dos exames (n= 122) obtidos pela investigação de pacientes através da técnica da Hibridização Genômica Comparativa por *arrays*, CGH *array*, no arquivo do Laboratório Neurogene desde 2008 até 2012 quanto a(s):

- Taxa de resultados alterados, onde o CGH *array* revelou ou contribuiu para a compreensão da etiologia da patologia do paciente;

- Principais indicações clínicas que levaram aos médicos solicitarem o exame investigativo por CGH *array*;

- Principais indicações clínicas encontradas nos exames de CGH *array* alterados;

- Avaliar a taxa diagnóstica nos resultados de exames dos pacientes em relação as indicações clínicas: com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes;

- Tipos de alterações genômicas mais encontradas na amostra;

- Comparar as taxas diagnósticas desta amostra com a literatura internacional.

4. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

4.1 Desenho amostral

A amostra foi composta de 122 resultados de exames de CGH *array*, solicitados desde 2008 até dezembro de 2012, através dos convênios: SUS, UNIMED, convênios interlaboratoriais ou particulares, do Laboratório de Genética Humana Neurogene.

A grande maioria dos pacientes, que foram submetidos ao estudo do CGH *array*, passaram por investigação prévia de cariótipo convencional (Banda G) e também para a mutação patogênica que causa a Síndrome do X-Frágil (gene *FMR1*). Os resultados dos exames foram fornecidos pelo Laboratório Neurogene de forma sigilosa, não comprometendo a identidade do paciente ou do médico. Os mesmos foram informados através de um código identificador, com a indicação clínica pela qual foi solicitado, a plataforma utilizada e o resultado do mesmo.

4.2 Coleta de dados clínicos

Em um segundo momento, entrou-se em contato com os médicos solicitantes do exame de CGH *array* (geneticistas e neurologistas pediátricos) para verificar se estariam dispostos a fornecer mais detalhes através do preenchimento do questionário (ANEXO I), complementando as indicações clínicas pelas quais os pacientes foram encaminhados ao exame. Houve concordância dos mesmos com o descrito acima, e essa investigação foi feita através do código identificatório fornecido pelo Laboratório Neurogene (preservando a identidade dos pacientes). Os dados clínicos como grau de comprometimento intelectual, a presença/ausência de dismorfias (quais), a presença/ausência de mal formações (se sim, quais), além de outras particularidades clínicas, foram assim informados tanto para resultados positivos quanto para negativos.

4.3 Coleta das amostras

As amostras com 10 ml de sangue periférico para a realização do CGH *array* foram coletadas no Laboratório Neurogene, depositadas em tubos com EDTA e devidamente

identificadas. Uma vez que Santa Catarina não possuía a tecnologia para a realização do exame, as mesmas foram encaminhadas para o Grupo de Estudos do Genoma Humano (USP- Universidade de São Paulo), com o qual o laboratório possuía um convênio, onde os exames de CGH *array* foram executados pela Dra. Carla Rosenberg e sua equipe.

Questionários prévios e TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) foram entregues aos pais/responsáveis dos pacientes. Após serem preenchidos e devidamente assinados, foram enviados junto às amostras de sangue para Grupo de Estudos do Genoma Humano.

4.4 CGH *array*

Para execução do exame de CGH *array* foram utilizadas as plataformas *Human Genome CGH Microarray 44k ou 60K* (produzida pela Agilent Technologies). Essas plataformas contêm cerca de 44.000 a 60.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano, com sequências baseadas versão HG 18 (*Human Genome 36.1*) do genoma humano. O exame de CGH *array* foi realizado utilizando DNA genômico extraído de sangue periférico do paciente. As amostras foram marcadas, hibridizadas e lavadas, de acordo com o protocolo do fabricante. Basicamente, as amostras foram marcadas usando o *CytoSure HT Genomic DNA Labelling Kit*. Amostras de DNA do indivíduo avaliado (DNA teste) e da amostra referência (DNA controle) foram incorporadas a fluorocromos, cianina 3 (Cys 3- verde) e cianina 5 (Cys 5- vermelho), respectivamente. Após serem marcados, foram submetidos à hibridização na lâmina contendo as sondas de DNA de localização conhecida nos cromossomos, utilizado o equipamento de hibridização *Agilent SureHyb*, seguindo as instruções do fabricante. Logo após foi feita a lavagem e as imagens foram escaneadas e processadas usando *Agilent Feature Extraction Software*, que mede a intensidade da fluorescência que os fluorocromos emitem e finalmente analisadas com o *software* comercial *Genome Workbench* (Agilent Technologies). Foram gerados gráficos com a localização de cada um dos oligonucleotídeos no genoma, e através de uma análise comparativa da amostra com a referência, analisando a intensidade da fluorescência foi determinado se houve ganho ou perda de segmentos cromossômicos (Figura 1). A Figura 2 mostra um fluxograma dos principais passos executados na técnica para a obtenção do exame.

Quando as alterações foram constatadas, foi realizada uma pesquisa das CNVs já encontradas, presentes em banco de dados disponíveis na internet, e pesquisadas na literatura para inferir se houve relação causal entre a alteração encontrada e o fenótipo do paciente.

Foram consideradas alterações com perdas e ganhos maiores que 400Kb, exceto quando genes conhecidamente patogênicos estão envolvidos.

Variações no número de cópias de sequências de DNA (CNVs) encontradas comumente na população em geral não foram consideradas e essas variações não constam no resultado do exame. Esta plataforma de CGH *array* não detecta alterações cromossômicas equilibradas (translocações recíprocas, inversões ou inserções), alterações do DNA mitocondrial ou mutações de ponto. Alterações cromossômicas em mosaico com frequência inferior a 30% não foram identificadas. Quando alterações com possível significado causal foram encontradas, os exames de CGH *array* dos pais foram realizados, para estabelecer se tratava ou não de um possível polimorfismo herdado.

Após a conclusão e interpretação dos testes um laudo foi emitido pelo Grupo de Estudos do Genoma Humano e enviado ao Laboratório Neurogene.

4.5 Análise das taxas de resultados positivos e indicações clínicas

Os exames de CGH *array* foram analisados e o número de exames com resultados causal positivo em relação ao total de exames solicitados foi registrado. Foram anotadas e classificadas as alterações encontradas nos exames alterados. As indicações clínicas para o exame obtidas através do preenchimento dos questionários com ajuda dos médicos (ANEXO I) foram relacionadas ao tipo de resultado (positivo ou negativo); à classe de alteração encontrada (microdeleção ou microduplicação/amplificação ou outra); à extensão dos cromossomos e às regiões envolvidas. Todos os resultados foram analisados à luz de dados publicados na literatura.

4.6 Análise dos dados

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

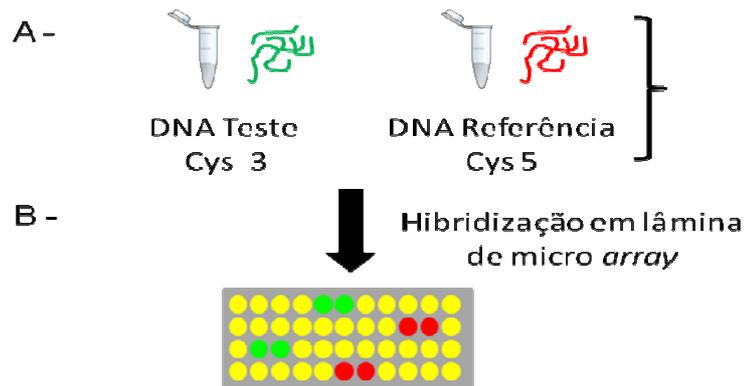


Figura 1 – Reação de marcação e hibridização do CGH *array*: A) Amostras de DNA do indivíduo a ser avaliado (DNA teste) e da amostra controle (DNA referência) são incorporadas a fluorocromos, cianina 3 (Cys 3- verde) e cianina 5 (Cys 5- vermelho), respectivamente; B) Hibridização em lâmina contendo as sondas.

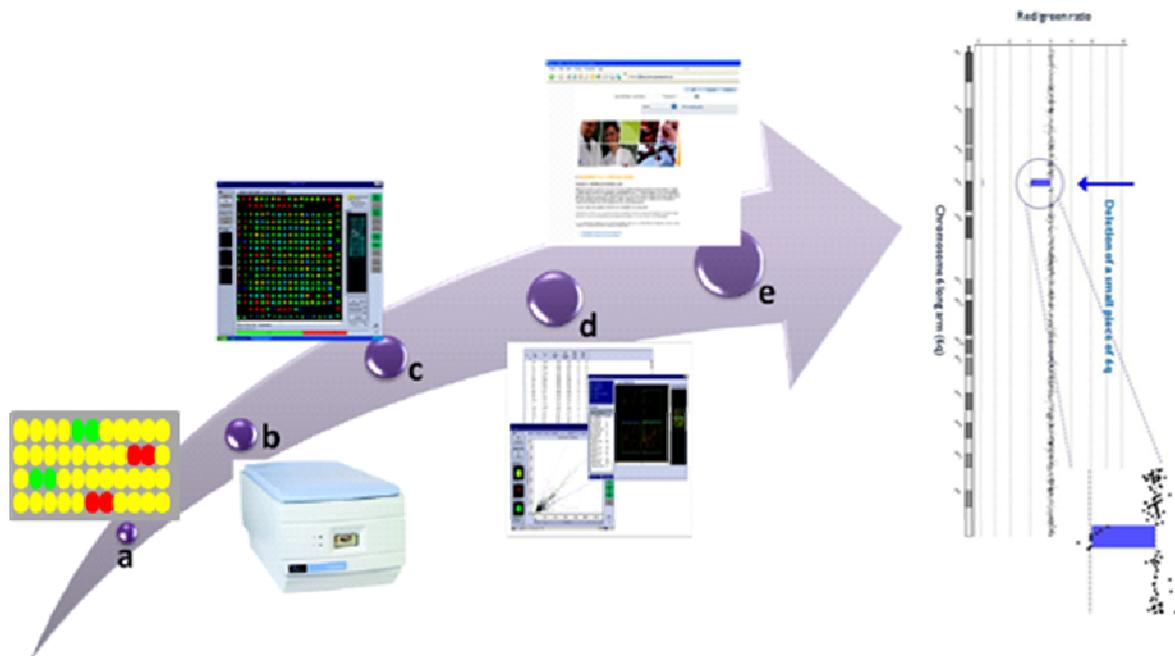


Figura 2 – Fluxograma dos principais passos da técnica de CGH *array* a partir da hibridização: a) hibridização; b) captura das imagens; c) análise dos comprimentos de onda; d) decodificação das imagens (arquivo numérico); e) análise dos dados numéricos gerados; f) leitura dos resultados. Modificado de MACHADO, 2010.

4.7 Considerações éticas

O presente trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão, e obteve aprovação sob o número: 015/2013 (ANEXO 2).

5. RESULTADOS

Foram analisados os resultados de exames de CGH *array* de uma amostra de pacientes do Laboratório Neurogene no período de 5 anos, abrangendo os anos de 2008 a 2012. Nesse período passaram pela investigação através do exame 151 pacientes, destes os TCLEs foram assinados por 122, que compõem a amostra analisada nesse estudo. Há 50 pacientes do sexo feminino e 72 do masculino, provenientes de diversos locais distribuídos principalmente pela região Sul do Brasil, em especial Santa Catarina. Destes, 35 pacientes (28,68%) tinham idade igual ou inferior a 5 anos de idade.

Na Figura 3 e na Tabela 1 estão dispostas, através de um gráfico e de uma tabela, as indicações clínicas dos médicos neuropediatras e geneticistas para solicitarem o exame de CGH *array*, podendo haver mais de uma indicação por exame.

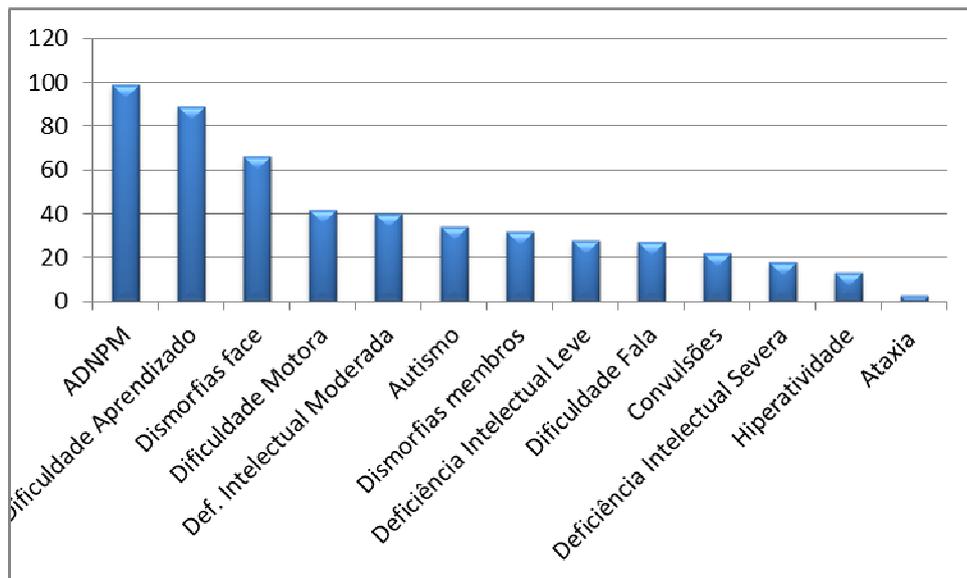


Figura 3 – Indicações clínicas dos médicos neuropediatras e geneticistas para solicitação do exame de CGH *array*, podendo haver mais de uma indicação por exame.

Tabela 1 – Número e porcentagem das indicações clínicas dos médicos neuropediatras e geneticistas para solicitação do exame de CGH *array*.

Indicação clínica*	Número	Porcentagem
ADNPM	99	81,15%
Dificuldade aprendizado	89	72,95%
Dismorfia de face	66	54,10%
Dificuldade motora	42	34,42%
Deficiência intelectual moderada	40	32,78%
Autismo	34	27,87%
Dismorfia de membros	32	26,23%
Deficiência intelectual leve	28	22,95%
Convulsões	22	18,03%
Deficiência intelectual severa	18	14,75%
Hiperatividade	13	10,65%
Ataxia	3	2,46%

*Podendo haver mais de uma indicação por paciente.

Quando considerada somente a morbidade principal apresentada por cada paciente, as indicações clínicas para a realização do exame de CGH *array* foram: Deficiência intelectual, 70,49% (DIL 22,95%, DIM 32,78%, DIS 14,74%), ADNPM 7,37% (pacientes com menos de 5 anos), Autismo, dificuldades de aprendizado, convulsões e outras (22,13%).

A partir dos resultados dos exames foram verificados que 30,32% dos exames de CGH *array* apresentaram alterações. A Tabela 2 apresenta as alterações cromossômicas encontradas nos resultados alterados, bem como seu tamanho, localização (intersticial ou terminal), classificadas em microdeleção ou microduplicação e indicação clínica pela qual o exame foi solicitado.

Tabela 2 – Alterações cromossômicas encontradas nos resultados dos exames de CGH *array* do Laboratório Neurogene de 2008 a 2012.

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	Del*	Dup	Int	Ter	Indicação clínica**
1	1p36.33-p36.32	1018337-3394442	2,5Mb	X			X	ADNPM, Convulsões, DF, DM
1	1p36.23-p36.22	8.349.960-10.371.006	2Mb	X		X		TDA, ADNPM, DF, DA, DIM, DF
1	1p36.23	7283244-9028267	1,7Mb	X		X		ADNPM, DA, DIS, DMot, DF
1	1q44	243.094.770 e 245.843.360	3Mb	X		X		Autismo, ADNPM, DA, DIS, DMot, Convulsões, DF.
2	2p16.3	50.936.722-50.975.845	39Kb	X		X		ADNPM, DA, DIM, Convulsões, DF.
2	2p24.3-p22.1	14.474.450-40.365.642	26Mb		X	X		ADNPM, DA, DIL, DF, DM
2	2p25.3	20.141-3.432.051	3,5Mb		X		X	ADNPM, DF, DA, DIL, DMot, DF, DM, Hiperatividade.
2	2p22.3	32.530.987-33.111.024	650Kb		X	X		ADNPM, DA, DIM, DF, DM, Convulsões e Autismo.
2	2q37.2-q37.3	236798070-242717216	6,7Mb	X			X	ADNPM, DF, DA, DIM, DMot,DF, DM.
2	2q22.1-q22.3	141622626-146901990	5,2Mb	X		X		ADNPM, DA, DIL, DF, autismo
3	3q13.13-q13.31	111263803-117942839	6,7Mb	X		X		Autismo (falta complementar questionário)
4	4p14-p11	39.644.232-62.840.793	23Mb		X	X		ADNPM, DA, DIL, DM, DF, DM
4	4q32.1	156517980-157541322	1Mb	X		X		Autismo (falta complementar questionário)
5	5p15.33-p15.2	110319-13719112	13,6Mb	X			X	ADNPM, DF, DMot.
5	5p15.31-p14.3	6898055-18989067	12,5Mb	X		X		ADNPM, DF, DM, Hiperatividade
7	7q31.32-q33	122.312.965- 135.747.233	13Mb		X	X		ADNPM, DA, DF,DIL
7	7q31.32-q33	122.609.467- 135.747.233	12,5Mb		X	X		ADNTP, DA, DIL
7	7q36.2-q36.3	153021056-158821457	5,8Mb		X		X	ADNPM, convulsões, DF, DM.
8	8p12-p11.1 e 8q11.1-q 11.22	38.480.497-51.485.260	13,3Mb		X	X		ADNPM, DA, DIL, DM, DF, DM
8	8p21.3	19.854.978-20.151.280	300Kb		X	X		Ataxia, ADNPM, DF, DA, DIL, DMot, DF
9	9p24.3	193.890-1.793.890	1,6Mb	X			X	ADNPM, DA, DIM, DF
9	9p22.2-22.1	17.735.113-19.274.106	1,4Mb	X		X		ADNPM, DA, DIL

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	Del*	Dup	Int	Ter	Indicação clínica**
9	9p24.3-p13.1	1.897.758-38.805.612	37Mb		X	X		ADNPM, DA DIM, DF
9	9p24.3- p21.3	193890-21698565	22Mb		X		X	ADNPM, DF, DA, DIS, DMot, DF, DM
11	11q24.2-q25	126.659.795- 134.343.758	7,7Mb	X			X	ADNPM, DF, DA, DIL, DMot, DF,DM, Hiperatividade
11	11q24.3-q25	128.565.909- 134.373.771	6Mb	X			X	ADNPM, DA, DIL
12	12q24.31- q24.33	123309075-132283607	9Mb	X			X	ADNPM, DA, DIS, DMot,DM,DF, Autismo
13	13q12.11	19305270-19662666	350Kb		X	X		DF
14	14q13.1	32117635-32643906	520Kb		X	X		ADNPM, DA, DIL, DM, DF
15	15q11.2-q13.1	20.316.801-26.233.173	6,2Mb	X		X		ADNPM, DA, DMot
15	15q11.2-q13	18946017-30230557	11,3Mb		X	X		ADNPM, DMot,DF
15	15q11.2- q13.1	18946017-26885070	8,5Mb		X	X		ADNPM, DF, DA, DMot, Autismo
15	15q11.2- q13.1	21258328-26233173	5Mb		X	X		ADNPM, DA, DIL, DF, DMot,Autismo
16	16p12.1	21907260-22.315.593	400Kb	X		X		Questionário incompleto
17	17p11.2	16.723.072-20.234.743	3,5Mb		X	X		ADNPM, DA, DIM, DF, DM, Hiperatividade
17	17p11.2	16.723.072-20.234.743	3,5Mb		X	X		ADNPM, DA, DIM, DF, DMot, DM, Hiperatividade
18	18q21.32-q23	54939961-76113948	21Mb	X			X	ADNPM, DA, DIS, DMot, DF, DM
18	18p11.32- p11.21	138889-14072075	14Mb	X			X	ADNPM, DA, DIL, DMot, DF, DM
18	18q22.1-q23	64.381.440-76.113.948	12Mb	X		X		ADNPM, DA, DIL, DF
18	Braço inteiro		16Mb		X	X		ADNPM, DF, DM, hiperatividade e convulsão
19	19p13.3	1.142.713-1.825.290	700Kb		X	X		ADNPM, DF, DA, DIS, DF
22	22q11.21	17274620-19770656	2,5Mb	X		X		ADNPM, DA, DIL, DMot ,DF
22	22q11.21	17.28-19.21	2,43Mb	X		X		ADNPM, DA, DIS, DMot
X	Xq24	118866869-118870506	3,6Mb		X	X		Autismo (falta complementar questionário)
TOTAL				23	21	32	12	

*Del – Deleção; Dup – Duplicação; Int – Intersticial; Ter – Terminal;

**Indicações clínicas: ADNPM – Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor; DF- Dificuldade de Fala; DA – Dificuldade de Aprendizado; DIL – Dificuldade Intelectual Leve; DIM - Dificuldade Intelectual Moderada; DIS - Dificuldade Intelectual Severa; DMot – Dificuldade Motora; DF – Dismorfia de Face; DM – Dismorfia de Membros

Nos resultados analisados não foram encontradas alterações para os cromossomos 6, 10, 20, 21, 23 e Y (Tabela 2). A maioria das deleções foi observada no cromossomo 1 (quatro vezes), e as duplicações apareceram o mesmo número de vezes (três vezes) nos cromossomos 2, 4, 7 e 15. O número de deleções e de duplicações foi de 23 e 21, respectivamente, e os tamanhos variam de 39kb a 21Mb para deleções e de 300Kb a 37Mb para duplicações. Já a localização (intersticial ou terminal) apresentou diferença marcante, a maioria (n=32) sendo intersticial, e somente 12 foram terminais.

Na Tabela 3 estão listadas as principais indicações clínicas para o exame de CGH *array* e o seu percentual nos exames em que o resultado do CGH *array* apresentou alterações.

Tabela 3 – Porcentagem das principais indicações clínicas para os exames de CGH *array* que apresentaram alterações.

Indicação Clínica*	Número	% nos exames positivos
ADNPM	33	89,18%
Dismorfia de face	29	78,37%
Dificuldade aprendizado	28	75,67%
Dificuldade motora	17	45,94%
Dismorfia de membros	14	37,83%
Deficiência intelectual leve	13	35,13%
Dificuldade fala	9	24,32%
Autismo	8	21,62%
Deficiência intelectual moderada	7	18,91%
Deficiência intelectual severa	6	16,21%
Hiperatividade	6	16,21%
Convulsões	5	13,51%
Ataxia	1	2,70%

*Todas possuíam mais de uma indicação clínica.

Considerado apenas a principal indicação clínica para os exames de CGH *array* que apresentaram alterações, obteve-se: Deficiência intelectual, 70,27% dos exames positivos (35,13% DIL, 18,91 DIM e 16,21 para DIL); ADNPM, 18,91%; Autismo e outros, 10,81%.

Quando se verifica o percentual de exames que foram solicitados para pacientes com traços dismórficos ou sindrômicos marcantes, ou sem dismorfologias, a porcentagem foi de 54,10% e 45,90%, respectivamente.

Um dos objetivos deste trabalho foi observar a porcentagem de resultados que apresentaram alterações genômicas nos exame de CGH *array* dentre os pacientes

classificados pelos médicos como pacientes que apresentam dismorfias (de face e/ou membros) e sem dismorfias. O encontrado foi 43,93% nos pacientes que apresentavam dismorfias, já no grupo sem dismorfias a porcentagem foi de 14,28%.

Para as indicações clínicas sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes, de face e/ou membros, as principais indicações clínicas estão listadas na Tabela 4, podendo haver mais de uma indicação por paciente.

Tabela 4 – Porcentagem das principais indicações clínicas para o exame de CGH *array* em pacientes sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes.

Indicação Clínica*	Número	Porcentagem
ADNPM	31	55,35%
Dificuldade aprendizado	28	50%
Deficiência intelectual moderada	13	23,21%
Autismo	12	21,42%
Dificuldade Motora	10	17,85%
Deficiência intelectual leve	8	14,28%
Dificuldade fala	7	12,5%
Convulsões	6	10,71%
Deficiência intelectual severa	5	8,92%
Hiperatividade	3	5,35%
Ataxia	2	3,57%

*Podendo haver mais de uma indicação por paciente.

Também havia o interesse em verificar se nos resultados positivos dos exames haveria diferença quanto ao tipo e extensão da alteração encontrada entre pacientes com e sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes. Para isto, agruparam-se as alterações cromossômicas encontradas no grupo sem dismorfias na Tabela 5 e com dismorfias na Tabela 6.

Tabela 5 – Alterações cromossômicas encontradas no exame de CGH *array* de pacientes sem traços dismórficos.

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	ID do				
				Paciente	Deleção	Duplicação	Intersticial	Terminal
3	3q13.13-q13.31	111263803-117942839	6,7Mb	1	X		X	
4	4q32.1	156517980-157541322	1Mb	2*	X		X	
7	7q31.32-q33	122.609.467-135.747.233	12,5Mb	3*		X	X	
9	9p22.2-22.1	17.735.113-19.274.106	1,4Mb	3*	X		X	
11	11q24.3-q25	128.565.909-134.373.771	6Mb	4	X			X
15	15q11.2-q13.1	20.316.801-26.233.173	6,2Mb	5	X		X	
15	15q11.2-q13.1	18946017-26885070	8,5Mb	6		X	X	
16	16p12.1	21907260-22.315.593	400Kb	7	X		X	
22	22q11.21	17.28-19.21	2,43Mb	8	X		X	
X	Xq24	118866869-118870506	3,6Mb	2*		X	X	
TOTAL					7	3	9	1

*Pacientes com mais de uma alteração

Tabela 6 – Alterações cromossômicas encontradas no exame de CGH *array* de pacientes com traços dismórficos.

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	ID do paciente	Deleção	Duplicação	Intersticial	Terminal
1	1p36.33-p36.32	1018337-3394442	2,5Mb	9*	X			X
1	1p36.23-p36.22	8.349.960-10.371.006	2Mb	10	X		X	
1	1p36.23	7283244-9028267	1,7Mb	11	X		X	
1	1q44	243.094.770 e 245.843.360	3Mb	12	X		X	
2	2p16.3	50.936.722-50.975.845	39Kb	13	X		X	
2	2p24.3-p22.1	14.474.450-40.365.642	26Mb	14		X	X	
2	2p25.3	20.141-3.432.051	3,5Mb	15*		X		X
2	2p22.3	32.530.987-33.111.024	650Kb	16		X	X	
2	2q22.1-q22.3	141622626-146901990	5,2Mb	17	X		X	
2	2q37.2-q37.3	236798070-242717216	6,7Mb	18	X			X
4	4p14-p11	39.644.232-62.840.793	23Mb	19*		X	X	
5	5p15.33-p15.2	110319-13719112	13,6Mb	20	X			X
5	5p15.31-p14.3	6898055-18989067	12,5Mb	21	X		X	
7	7q31.32-q33	122.312.965-135.747.233	13Mb	22		X	X	
7	7q36.2-q36.3	153021056-158821457	5,8Mb	9*		X		X
8	8p12-p11.1 e 8q11.1-q 11.22	38.480.497-51.485.260	13,3Mb	19*		X	X	
8	8p21.3	19.854.978-20.151.280	300Kb	23		X	X	
9	9p24.3	193.890-1.793.890	1,6Mb	24*	X			X
9	9p24.3-p13.1	1.897.758-38.805.612	37Mb	24*		X	X	

Cromossomo	Bandas	Posição Genômica	Tamanho	ID do paciente	Deleção	Duplicação	Intersticial	Terminal
9	9p24.3- p21.3	193890-21698565	22Mb	25*		X		X
11	11q24.2-q25	126.659.795-134.343.758	7,7Mb	15*	X			X
12	12q24.31- q24.33	123309075-132283607	9Mb	26	X			X
13	13q12.11	19305270-19662666	350Kb	27		X	X	
14	14q13.1	32117635-32643906	520Kb	28		X	X	
15	15q11.2-q13	18946017-30230557	11,3Mb			X	X	
15	15q11.2- q13.1	21258328-26233173	5Mb	29		X	X	
17	17p11.2	16.723.072-20.234.743	3,5Mb	30		X	X	
17	17p11.2	16.723.072-20.234.743	3,5Mb	31		X	X	
18	18p11.32- p11.21	138889-14072075	14Mb	32	X			X
18	18q21.32-q23	54939961-76113948	21Mb	25*	X			X
18	18q22.1-q23	64.381.440-76.113.948	12Mb	33	X		X	
18	Braço inteiro		16Mb	34		X	X	
19	19p13.3	1.142.713-1.825.290	700Kb	35		X	X	
22	22q11.21	17274620-19770656	2,5Mb	36	X		X	
TOTAL				29	16	18	23	11

*Pacientes com mais de uma alteração

Nos pacientes não síndrômicos, 5 apresentaram uma deleção, 1 uma duplicação e 2 uma duplicação acompanhada por uma deleção. Os tamanhos das alterações variaram de 400Kb a 12,5Mb, e apenas uma foi terminal (Tabela 5).

Em pacientes com traços dismórficos, o número de deleções e de duplicações foi muito parecido, sendo 13 pacientes com uma deleção, 14 com uma duplicação, 3 com duplicação associada a uma deleção e somente 1 com duas duplicações. Os tamanhos das alterações variaram de 39Kb a 37Mb, um terço das quais em localização terminal (Tabela 6).

Um total de 59 pacientes (48,36%) realizou o exame de cariótipo previamente ao exame de CGH *array*. Destes, 39 eram normais e 20 inconclusivos.

Quando analisados os exames de CGH *array* alterados (n=37), 10 apresentaram o cariótipo normal (27,02%) e 10 (27,02%) apresentaram cariótipos alterados ou inconclusivos (translocações, alterações de difícil significado).

Outros exames foram realizados previamente ao CGH *array*: 27 indivíduos (22,13%) realizaram ressonância magnética do cérebro e 24 indivíduos (19,67%) foram testados para Síndrome do X-frágil (com resultado negativo).

Quando analisados na amostra total (n=122), houve 13 pacientes (10,65%) com antecedentes síndrômicos na família, dos quais 6 (46,15%) tiveram o exame com resultado alterado.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Características da Amostra

O CGH *array* é um método que possibilita uma análise refinada de todo o genoma. Esta ferramenta tornou-se de extremo interesse que, cada vez mais vem sendo usado no diagnóstico clínico e na investigação de casos idiopáticos (de causa desconhecida) de distúrbios do desenvolvimento. A amostra de 122 resultados de exames de CGH *array* é composta na sua maioria de pacientes do sexo masculino, 72 e 50 do sexo feminino, 28,68% dos quais com idade inferior a 5 anos, advindos dos estados da região Sul.

A composição da amostra reflete um leve predomínio de pacientes do sexo masculino (em torno de 60%), o que corrobora com o fato de haver mais indivíduos masculinos com deficiência intelectual e/ou autismo na população em geral, atribuído em parte as condições ligadas ao X e a outras não bem estabelecidas.

6.2 Principais indicações clínicas para solicitações do exame de CGH *array*

Revisando a literatura, constata-se que as principais indicações clínicas para realizar o exame de CGH *array*, em pacientes que ainda não são classificados em uma síndrome definida, são o atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual e presença de características dismórficas (DARILEK *et al.*, 2008), sendo essas também algumas das principais indicações clínicas que médicos de Santa Catarina usaram para solicitar o exame nos sujeitos analisados nesta pesquisa. Considerando de forma específica a principal indicação para o pedido do exame, predomina a indicação por deficiência intelectual em grau variado (70,27%), seguida por ADNPM (7,37%) como principal indicação. Considerando-se todas as morbidades apresentadas pelos pacientes (geralmente duas ou mais por paciente), as que assumem o ranking das indicações no pedido do exame são o ADNPM apresentado por 81,15% dos pacientes, seguido pela dificuldade de aprendizado (72,95%), deficiências intelectuais, 70,49% (DIL, 20,47%, DIM, 32,78%, DIS, 14,75%), e dismorfias de face (54,10%). Com frequência menor, encontra-se dificuldade motora (34,42%), autismo (27,87%), dismorfias de membros (26,23%), dificuldade de fala (22,13%), convulsões (18,03%), hiperatividade (10,75%)

e ataxia (2,46%) (Tabela 1 e Figura 3). A predominância das indicações ao exame de CGH *array* foi ADNPM na infância e dificuldades de aprendizado, sendo que a maior parte posteriormente foi diagnosticada com alguma deficiência intelectual (leve, moderada ou severa). Dismorfias, especialmente de face, foram indicações secundárias muito frequentes para a solicitação do exame. Um estudo dinamarquês, que também avaliou as indicações para CGH *array*, igualmente encontrou deficiência intelectual e dismorfias muito a frente das outras indicações (KIRCHHOFF, ROSE, & LUNDSTEEN, 2001).

6.2.1 Porcentagem de exames de CGH *array* alterados

No estado de Santa Catarina, a porcentagem de resultados de CGH *array* com alterações que foram consideradas provavelmente patogênicas foi de 30,32%, enquanto a literatura cita percentuais diagnósticos em torno de 15% a 20% (MILLER *et al.*, 2010). No Brasil, trabalhos realizados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) coordenados pela pesquisadora Carla Rosenberg encontraram, dependendo do critério clínico de seleção, alterações cromossômicas provavelmente patogênicas em 17% a 30% dos pacientes afetados por deficiência intelectual e/ou anomalias congênitas, ratificando assim que o CGH *array* tornou-se um método diagnóstico muitíssimo vantajoso para estudar a causa genética de distúrbios do desenvolvimento humano, principalmente quando empregado de forma criteriosa (KREPISCHI-SANTOS *et al.*, 2006). Dentre os 37 exames que apresentaram resultado de CHG *array* com alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas, haviam 10 pacientes cujos cariótipos não eram normais e o exame foi solicitado para esclarecer de forma mais definida a região afetada. Isto representa um viés nos resultados. Quando a análise é feita excluindo-se os pacientes já previamente selecionados por apresentarem cariótipo alterado, o percentual de exames positivos é de 24,10%, em plena concordância com o relatado na literatura internacional.

6.3 Principais indicações clínicas em exames de CGH *array* alterados

Quando se considera apenas os exames de CGH *array* positivos, ou seja, que alterações genéticas foram encontradas, a principal indicação apresentada por cada

paciente foi deficiência intelectual, 70,27% (DIL 35,13%, DIM 18,82%, DIS 16,21%); ADNPM, 18,91%, Autismo e outros em 10,81%. Em relação a todas as morbidades marcantes apresentadas pelos pacientes (geralmente duas ou mais por paciente) as principais foram ADNPM (89,18%), dismorfia de face (78,37%), dificuldade de aprendizado (75,67%), dificuldade motora (45,94%), dismorfia de membros (37,83%), dificuldade de fala (24,32%), autismo (21,62%), hiperatividade (16,21%), convulsões (13,51%) e ataxia (2,70%) (Tabela 3).

A etiologia do atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) é um desafio para os médicos que investigam essa condição, principalmente em crianças. Essa foi a principal indicação clínica para a realização do exame (81,15%), na maior parte das vezes como um diagnóstico retrospectivo, uma vez que somente 35 dos 122 pacientes, 28,68%, tinha menos de 5 anos. Destes, 22 foram considerados como apresentando algum grau de deficiência intelectual, um diagnóstico que segundo a literatura (SHAFFER, 2005) usualmente é considerado formalizado após a aplicação de um teste de QI, e por isto geralmente se considera que as crianças até esta idade apresentam ADNPM. Porém, para maioria dos diagnósticos de DI no Brasil o teste de QI não é utilizado de forma rotineira, principalmente quando a DI é evidente. Na maioria das vezes, os médicos firmam o diagnóstico de deficiência intelectual através de uma série de comorbidades associadas.

Se forem consideradas apenas as 10 crianças abaixo de 5 anos com ADNPM, a maioria com dismorfologias associadas, 28,57% apresentaram resultados alterados. Isso corrobora com um estudo realizado em Taiwan, que ainda afirma que as porcentagens aumentam se houver dismorfias/malformações associadas e se forem intersticiais (LIANG, SHIMOJIMA, & YAMAMOTO, 2008) e com outro estudo em que alterações foram encontradas em 22,5% dos resultados de pacientes que tinham atraso no desenvolvimento e/ou anomalias congênitas (WINCENT, ANDERLID, LAGERBERG, NORDENSKJÖLD, & SCHOUMANS, 2011).

6.4 Comparações entre as principais indicações clínicas para as solicitações gerais do exame de CGH *array* e os exames de CGH *array* alterados

Quando os percentuais de indicações clínicas apresentadas pelos pacientes são comparadas aos percentuais de indicações clínicas dos resultados de CGH *array* alterado, foram encontrados que: ADNPM, dismorfias de face, dificuldades de aprendizado, dificuldades motoras, dismorfia de membros, deficiência intelectual leve (DIL), hiperatividade e deficiência intelectual severa (DIS) apresentaram uma taxa maior nos exames alterados do que a porcentagem que apresentam nas indicações para o exame (indicados pelo símbolo * em negrito Tabela 7).

A deficiência intelectual leve, as dismorfias de face e membros, dificuldade motora e hiperatividade são indicações para as quais mais de 40% dos seus resultados de CGH *array* deram alterados (indicados pelo símbolo #, Tabela 7). Para estabelecer esta porcentagem foi calculada a proporção do número de indicações dos exames alterados divididos pelos solicitados (por exemplo: 29/66 para dismorfia de face). Foram consideradas as indicações clínicas que sobressaíram acima de 40% dos exames de CGH *array* alterados.

Tabela 7 - Indicações que serviram de argumento para a realização de exames de CGH *array* comparados as indicações nos de exames de CGH *array* com resultados alterados.

Indicação clínica	Em exames solicitados		Em exames alterados	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
ADNPM	99	81,15%	33	*89,18%
Dificuldade aprendizado	89	72,95%	28	*75,67%
Dismorfia de face	66	54,10%	29	#78,37%
Dificuldade motora	42	34,42%	17	#45,94%
Deficiência intelectual moderada	40	32,78%	7	18,91%
Autismo	34	27,87%	8	21,62%
Dismorfia de membros	32	26,23%	14	#37,83%
Deficiência intelectual leve	28	22,95%	13	#35,13%
Convulsões	22	18,03%	5	13,51%
Deficiência intelectual severa	18	14,75%	6	*16,21%
Hiperatividade	13	10,65%	6	#16,21%
Ataxia	3	2,46%	1	2,70%

* Indicações mais frequentes em exames de CGH *array* alterados do que nas solicitações. # Indicações para as quais mais de 40% deram resultado do exame de CGH *array* alterado. Obs: Nenhuma indicação foi utilizada isoladamente.

Os pacientes com deficiência intelectual leve como a indicação principal, obtiveram uma alta taxa de exames alterados (46,42% das vezes em que DIL foi indicação) se comparada às obtidas para deficiência intelectual moderada (17,50%) e para deficiência intelectual severa (33,33%) (Tabela 7). Isto surpreende, uma vez que o exame de CGH *array* tende a ser mais solicitado em casos de deficiência intelectual moderada e severa. O percentual mais baixo para pacientes com deficiência intelectual moderada e severa, deve-se possivelmente por apresentarem alterações maiores

previamente já identificadas pelo cariótipo convencional ou, no caso de síndromes conhecidas diagnosticadas por FISH.

Dentre as deficiências intelectuais, a deficiência intelectual leve é aquela para a qual menos se conhece as causas, uma vez que alterações visíveis no cariótipo geralmente envolvem uma grande quantidade de genes (50 ou mais) o que dificilmente resulta em um quadro clínico sutil. Os exames de CGH *array* estão mostrando que também em pacientes com DIL, deleções e duplicações são causas importantes de patogenicidade, porém, envolvendo segmentos bem menores que os visíveis no cariótipo. Os casos com resultado negativo no CGH *array*, provavelmente se devem a causas monogênicas ou multifatoriais.

Recentes estudos verificaram alterações em 18,60% nos pacientes com deficiência intelectual e/ou características dismórficas associadas (SIGGBERG *et al.*, 2010); 20-25% para deficiência intelectual de moderada à severa associada com características dismórficas ou malformações (BEAUDET, 2013), ou 24% para dificuldade de aprendizado associada a dismorfologias (SHAW-SMITH, 2004). No presente trabalho, somando todos os exames alterados que tinham como indicação algum grau de DI, foram observadas alterações em 30,23% do CGH *array* dos pacientes. Se forem considerados apenas os que apresentavam DI com dismorfologias o percentual de exames alterados aumenta para 41,81%, em média, (57,89% para DIL, 55,50% para DIS e 25,92% para DIM), indicando a importância do CGH *array* nestes casos (Tabela 8).

Tabela 8 – Exames alterados em pacientes com deficiência intelectual.

Tipo de DI	Total de pacientes	Com dismorfias de face	CGH <i>array</i> alterado		Sem dismorfias	CGH <i>array</i> alterado	
			Número	Percentual		Número	Percentual
DIL*	28	19	11	57,90%	9	2	22,22%
DIM*	40	27	7	55,50%	13	0	0%
DIS*	18	9	5	25,92%	9	1	11,11%
Total c/ DI*	86	55	23	41,81%	31	3	9,67%

*DI – Deficiência Intelectual; DIL – Deficiência Intelectual Leve; DIM – Deficiência Intelectual Moderada; DIS – Deficiência Intelectual Severa.

Um trabalho realizado por Williams e colaboradores (WILLIAMS *et al.*, 2010), estudou especificamente a frequência de CNVs em 366 crianças com TDAH (Transtorno do *Défict* de Atenção ou Hiperatividade), dos quais 33 tinham deficiência intelectual leve a moderada (QI médio de 60), e comparou com 1047 crianças controle, encontrou que 36% das crianças com TDAH com DI portavam CNVs maiores que 500kb em comparação a 11,4% em crianças com TDAH sem DI e 7% em crianças do grupo controle.

TDAH foi co-indicação para 10,65% do total dos pacientes para os quais foi solicitado o exame de CGH *array* em neste estudo. O percentual de pacientes com TDAH nos resultados de exames alterados foi de 16,21% significativamente superior ao percentual de indicações. Se forem considerados apenas os pacientes para os quais TDAH foi uma co-indicação para a realização do exame, 46,15% dos mesmos teve seu exame alterado, o que supera as taxas descritas por Williams *et al* (2010), para crianças com TDAH e DI. Isto corrobora que a presença de hiperatividade como co-morbidade em pacientes com DI ou ADNPM é um indicativo importante para solicitar o exame de CGH *array*.

Nos casos em que autismo foi uma comorbidade, 21,62% dos exames mostraram alterações, o que corrobora com os índices encontrados na literatura (20-30%) (revisado por BEAUDET, 2013). Plataformas mais recentes com grau de resolução maior parecem ser mais adequados para analisar casos de autismo (PRASAD *et al.*, 2012).

6.5 Principais indicações clínicas em exames de CGH *array* em pacientes com e sem traços dismórficos/sindrômicos

Nos exames solicitados, divididos apenas em com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes, a porcentagem dos pacientes com distúrbios foi de 54,10% e o restante, 45,90% dos pacientes não apresentavam nenhuma dessas características, porém os exames foram solicitados por outros motivos (Tabela 4). Quando o paciente não apresentava nenhuma distúrbio facial ou de membros marcante a maior porcentagem de solicitação foi para o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (55,35%), seguido de dificuldade de aprendizado (50%), deficiência intelectual moderada (23,21%), autismo

(21,42%), dificuldade motora (17,85%), deficiência intelectual leve (14,28%), dificuldade na fala (12,5%), convulsões (10,71%), deficiência intelectual severa (8,92%) e hiperatividade (5,35%) e ataxia (3,57%) (Tabela 4).

Quando comparada indicações de exame de pacientes sem dismorfias (Tabela 4) com as principais solicitações gerais (Tabela 1), porém não analisando nessa tabela a porcentagem de dismorfias de membros e face, são muito parecidas as indicações dos pacientes em ambas as tabelas. Nas duas as principais indicações foram atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado e as últimas indicações convulsões, deficiência intelectual severa, hiperatividade e ataxia, respectivamente.

6.5.1 Porcentagem de exames de CGH *array* alterados em pacientes com e sem dismorfias

Calculou-se também a porcentagem de resultados nos exame de CGH *array* que apresentaram microalterações cromossômicas dentre os pacientes classificados pelos médicos em com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes de face e/ou membros. No grupo de pacientes sem dismorfias a porcentagem foi de 14,28% (8 de 56 pacientes), já no grupo com dismorfias (de face e/ou membros) o exame obteve alterações em 43,93% (29 de 66). Em relação as alterações cromossômicas encontradas nos resultados alterados dos exames de CGH *array*, houve diferença quanto ao tipo, localização e extensão de alteração encontrada entre esses pacientes (Tabela 5 e Tabela 6).

Os pacientes sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes, o número de deleções (n=5) foi muito superior ao número de duplicações (n=1), já nos pacientes dismórficos a proporção entre deleções e duplicações foi muito semelhante (13 e 14, respectivamente). Estes dados sugerem que, nestes casos, deleções não tendem a ser mais deletérias que duplicações, ao contrário do que muitas vezes é suposto.

Entre os pacientes sem dismorfias 25% (2 de 8 pacientes) apresentaram simultaneamente uma duplicação e uma deleção contra 13,79% (4 de 29) deste tipo de alteração em pacientes dismórficos. Com um número de apenas 8 pacientes sem

dismorfias com exame alterado esses resultados podem indicar uma tendência, porém devem ser considerados com cautela.

Quanto ao tamanho das alterações cromossômicas encontradas, o espectro em pacientes dismórficos (39Kb a 37Mb) é maior do que não dismórficos (400Kb a 12,5Mb). A localização das alterações, a maioria foi intersticial para todos os pacientes, porém, um terço das alterações em pacientes dismórficos foi terminal, enquanto para pacientes não dismórficos só uma alteração foi terminal (Tabela 5 e 6).

Mesmo ocorrendo essas diferenças nos resultados dos exames destes pacientes, na literatura é recomendado que seja feito o exame de CGH *array* para todos os casos de deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento, associados ou não a dismorfias, uma vez que o exame apresenta importantes contribuições na investigação genética também em pacientes sem traços marcantes (MANNING & HUDGINS, 2010; SHOUKIER *et al.*, 2013).

6.6 Principais achados clínicos em exames alterados de CGH *array*

Observa-se, na Tabela 2, que em seis cromossomos não há nenhuma alteração encontrada, sendo eles os cromossomos 6, 10, 20, 21, 23 e Y, em contrapartida, sete cromossomos apresentaram duas alterações: seis com uma duplicação e uma deleção e um somente com duas duplicações, nenhum apresentou mais de uma deleção. Já o cromossomo 2 apresenta o maior número de alterações, seis das quarenta e quatro totais, sendo três deleções e três duplicações. A maioria das deleções (quatro) ocorreu no cromossomo 1, sendo duas na mesma banda (1p36.23) e outra em uma região muito próxima (1p36.33), a quarta fica no outro braço cromossômico (q), na banda 1q44.

A deleção 1p36 no cromossomo 1 normalmente é menor do que a resolução que poderia ser vista através de exame de cariótipo tradicional e é o típico exemplo de uma nova síndrome que vem sendo conhecida e descrita com aumento do uso do exame de CGH *array*. Ocorre uma vez a cada cinco mil nascimentos vivos e as características associadas a essa condição são deficiência intelectual, hipotonia, defeitos no coração, atraso no desenvolvimento, convulsões, entre outros (GAJECKA, MACKAY, & SHAFFER, 2007; KANG *et al.*, 2007).

O maior número de duplicações (três) foi apresentado pelos cromossomos 2, 7 e 15. A maioria das alterações encontradas nos pacientes da amostra estudada foi intersticial. Outros trabalhos realizados pela Dra. Carla Rosenberg também encontraram mais alterações localizadas intersticialmente, e outro estudo sugere que as anormalidades genéticas da deficiência intelectual e do atraso no desenvolvimento sejam principalmente intersticiais (LIANG *et al.*, 2008; ROSENBERG *et al.*, 2006). Quanto ao tamanho das deleções e duplicações, estas variaram de 39Kb a 37Mb, uma faixa de detecção e especificidade que está de acordo com a esperada para este exame (LINHARES, SVARTMAN, & VALADARES, 2012).

Por ser um exame que faz uma análise completa do genoma, seus achados estão permitindo compreender mecanismos ligados a doenças, novos genes e a descrição de novas síndromes que começaram a correlacionar resultados de exames muito parecidos com os fenótipos, na maioria das vezes parecidos, entre os pacientes. Isso é possível graças a consultas realizadas em banco de dados como o OMIM, ISCA e DECIPHER. Os resultados desta pesquisa apresentam cinco tipos diferentes de síndromes que foram encontradas nesses locais de consulta, sendo que uma delas ocorre quatro vezes (Síndromes de Prader-Willi/Angelman), três delas ocorrem duas vezes (Síndrome DiGeorge, Potocki-Lupski, Cri du Chat) e a outra apenas uma vez (Síndrome de Jacobsen). Mais síndromes conhecidas (Prader-Willi/Angelman e 1p36) foram encontradas em pacientes (n=2) que não autorizaram o uso dos dados através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A Síndrome de Potocki-Lupski (OMIM 610883), que apareceu em dois resultados deste estudo (em pacientes gêmeos), caracteriza-se pela duplicação 17p11.2 e está presente em aproximadamente 1 de cada 25 mil nascimentos. O tamanho mais encontrado da duplicação (~3,7Mb) na literatura corrobora com os aqui encontrados (ambas com 3,5Mb), bem como as características que vem sendo associadas a ela, como deficiência intelectual, dificuldade de aprendizado, hipotonia, dificuldades comportamentais, dismorfias, autismo e problemas cardíacos (C. G. LEE, PARK, YIM, & SOHN, 2012; POPOWSKI *et al.*, 2012).

A Síndrome de Jacobsen (OMIM 147791), ocorre em uma maior proporção no sexo feminino, sendo estimada uma vez para cada cem mil nascimentos. Apesar da síndrome estar associada à características dismórficas, especialmente faciais, o paciente da amostra estudada possuía essas características de forma muito sutil, porém, outras

característica da síndrome como o atraso no desenvolvimento neurológico e do aprendizado foram a indicação para o exame. Apesar da deleção na região 11q24.2 ser a característica da síndrome, muitos pacientes a possuem envolvendo a região 11q23 e os fenótipos normalmente variam de acordo com o tamanho da deleção. O tamanho tipicamente encontrado é de 7 a 20Mb, porém, neste estudo a deleção possuía 6Mb, podendo ser esta uma explicação para a ausência de características dismórficas, uma vez que pode não ter envolvido regiões com o(s) gene(s) responsável(eis) pelas dismorfias mais marcantes (JOHNSON *et al.*, 2013; MATTINA, PERROTTA, & GROSSFELD, 2009).

A Síndrome DiGeorge (OMIM 188400) caracterizada pela deleção 22q11.2 também apareceu em dois resultados da amostra. Pode ser conhecida também como Síndrome Velocardiofacial (VCFS) e tem ocorrido uma vez em cada quatro mil nascimentos. A síndrome apresenta muitos fenótipos clínicos como dismorfias craniofaciais, malformações cardíacas, insuficiência velofaríngea, déficit cognitivo e dificuldade de aprendizagem, que também foram relatados nos pacientes deste estudo. O tamanho das deleções aqui encontradas (2,5Mb e 2,43Mb) são os tamanhos que são encontrado em 90% dos casos (~3Mb), sendo que o restante, cerca de 8%, são de tamanho menor (1,5Mb) (MICHAELOVSKY *et al.*, 2012).

A Síndrome de Cri du Chat (OMIM 123450), também chamada de Síndrome do Miado do Gato, não tem a sua incidência bem definida, variando de um em vinte mil nascimento à um em cinquenta mil nascimentos. É uma deleção que ocorre no braço curto do cromossomo 5, na região 5p15.1-5p15.3 O fenótipo do paciente pode apresentar como ruídos semelhantes a “gritos de gato” (característica marcante pela qual a síndrome popularmente é chamada), microcefalia, dismorfias faciais, deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento psicomotor, corroborando com as indicações feitas pelos médicos ao encaminhar os dois pacientes dessa pesquisa para o exame de CGH *array*. Um diagnóstico precoce de uma síndrome como essa permite intervenções pedagógicas e melhoras na qualidade de vida dos portadores e de suas famílias (KRISTOFFERSEN, 2008; PITUCH *et al.*, 2010).

As Síndromes de Prader-Willi (OMIM 176270) e Angelman (OMIM 105830) em 70% dos casos consiste na deleção de um segmento do cromossomo 15, no segmento 15q11-13, podendo ser de origem paterna e denominando-se Síndrome de Prader-Willi ou materna, sendo então chamada de Síndrome de Angelman. Encontrou-

se quatro resultados com essa alteração e, como uma das principais indicações clínicas dos médicos para a solicitação de três desses exames foi hipotonia, este um forte indício que a alteração encontrada poderia ser a de Prader-Willi, para estes casos (TRIFIRO *et al.*, 2003). Uma das deleções encontradas foi muito pequena no centro de *imprinting* para Prader-Willi, sendo que a paciente havia sido previamente investigada para a Síndrome P-W por FISH, com resultado negativo.

Houve outras alterações que apareceram mais de uma vez nos resultados (Tabela 2). A duplicação 7q31.32-q33 foi encontrada duas vezes, com tamanhos de 12,5Mb e 13Mb. Embora em apenas um dos paciente apresentou características dismórficas, os dois pacientes possuíam atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldade de aprendizagem e deficiência intelectual leve. Possivelmente estes pacientes possam servir de base para a descrição de uma nova síndrome, uma vez que não houve pacientes com a mesma deleção descritos na literatura, somente envolvendo regiões maiores.

Uma das alterações do cromossomo 7 está no mesmo paciente que possuía uma deleção no cromossomo 9, região p22.2-22.1. Na amostra estudada, todas as alterações encontradas no cromossomo nove (em três pacientes) envolveram mais de uma alteração. Um paciente possui ao mesmo tempo uma deleção no cromossomo 9 (9p24.3-p21.3) e outra duplicação no cromossomo 18, na região q21.32-q23. Algumas características fenotípicas dismórficas e problemas cardíacos são relatados na literatura, envolvendo tanto duplicações como deleções, encontradas na região 9p (DI BARTOLO *et al.*, 2012). O último caso envolvendo o cromossomo 9 é extremamente curioso e raro na literatura. Trata-se de um paciente que possui a co-existência de duas alterações, uma duplicação na região 9p24.3-p13.1 e uma deleção na região 9p24, nesse cromossomo. Um artigo recente sobre deleções e duplicações co-existindo no cromossomo 9 foi publicado com a finalidade de investigar também os achados clínicos (KOWALCZYK *et al.*, 2013). Entre esses achados, a deficiência intelectual e anomalias craniofaciais são algumas características do quadro que alterações na região 9p pode gerar, corroborando com as alterações do paciente.

6.7 CGH *array* e Cariótipo

Com o advento das novas tecnologias superando cada vez mais as limitações de resolução que o cariótipo possui, há um questionamento que já vem se instalando há algum tempo na comunidade médica e nos profissionais da saúde que trabalham com essa investigação genética como primeiro exame nos seus pacientes: o cariótipo realmente é o exame que deve ser solicitado primeiro? É crescente, na literatura, o número de repostas negativas a esse questionamento (AHN *et al.*, 2010; KIRCHHOFF *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2011). No Brasil, onde a mão de obra, mesmo especializada, ainda é relativamente barata e os equipamentos e insumos necessários as investigações moleculares mais sofisticadas são em sua grande maioria importados o cariótipo ainda é o exame de primeira escolha, na avaliação dos casos idiopáticos de distúrbios do desenvolvimento.

Nesta pesquisa, 59 pacientes (48,36%) possuíam o exame de cariótipo convencional previamente ao de CGH *array*. Destes, 39 apresentaram cariótipos normais e 20 cariótipos inconclusivos. Aproximadamente metade dos 37 exames de CGH *array* alterados (54,05%, n=20), passaram pela investigação do cariótipo (10 com cariótipo normal e 10 com cariótipo inconclusivo). Os cariótipos inconclusivos foram solicitados por apresentarem translocações aparentemente equilibradas em pacientes dismórficos, onde sempre há suspeita de que no sítio de translocação possa haver alguma microdeleção ou duplicação, ou por suscitarem dúvidas relacionadas à resolução.

A literatura relata que o CGH *array*, em casos de deficiência intelectual com ou sem dismorfias detecta alterações provavelmente patogênicas em cerca de 20% dos casos, enquanto o cariótipo apresenta resultados alterados em apenas metade (10%) desse valor (VELTMAN, 2006). O cariótipo ainda apresenta a desvantagem, frente ao CGH *array* de não apresentar com precisão a região genética afetada e os possíveis genes envolvidos. Algumas vezes, mesmo realizando o cariótipo, outros exames genéticos ou mesmo de imagem são solicitados antes do CGH *array*. Entre os exames prévios realizados pelos pacientes, além do cariótipo outros como ressonância magnética (22,13%) e X-frágil (19,67%) são requeridos, um percentual que se manteve semelhante entre os resultados positivos.

6.8 CGH *array* como primeiro exame

Com a realização do exame de CGH *array* como primeiro exame na investigação dos casos idiopáticos de distúrbios do desenvolvimento possivelmente haja uma economia financeira para a família de muitos dos pacientes (SAGOO, BUTTERWORTH, & SANDERSON, 2009).

A maior parte das alterações encontradas no cariótipo é detectada por CGH *array*. Os pacientes da amostra estudada geralmente passaram muitos anos em busca de um diagnóstico a se julgar pelo fato de mais de 70% dos mesmos terem idade superior a 5 anos. Os custos emocionais, financeiros e sociais associados a procura desse diagnóstico provavelmente supera os custos de realizar o exame de CGH *array*. Na amostra analisada, 30,32% dos pacientes finalmente terminaram a sua busca por respostas. Estes dados provavelmente mostram um direcionamento clínico correto, aumentando assim o índice de exames de CGH *array* alterados.

A opção pelo CGH *array*, além de diminuir a jornada diagnóstica, é uma importante ferramenta para o aconselhamento genético das famílias, pois permite inferir probabilidades de recorrência, possibilitando planejamento familiar. Também serve para antecipar os possíveis problemas a serem apresentados pelos pacientes, quando há relatos relacionados na literatura, possibilitando tratamentos preventivos.

Quase metade dos pacientes (46,15%) que apresentavam outros casos de síndromes e retardos na família tiveram o resultado alterado. Portanto, é sugerido fortemente que em casos familiares de etiologia desconhecida o exame de CGH *array* seja utilizado como uma importante e capacitada ferramenta nessa investigação.

6.9 Novas plataformas

Este estudo analisou os resultados dos exames de CGH *array* do Laboratório de Genética Humana Neurogene, que utilizou a plataforma *Human Genome CGH Microarray 44k ou 60K*, produzida pela Agilent Technologies, contendo cerca de 44.000 a 60.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano. A densidade e a distribuição espacial das sondas são um dos principais fatores que influenciam a aplicabilidade das plataformas para determinadas investigações e exames.

Há toda uma geração de novas plataformas que além de apresentarem uma densidade de oligonucleotídeos muito maior (na ordem de milhões), também apresentam centenas de SNPs. Com isso, há a possibilidade de reconhecer regiões de perda de homozigosidade e microdeleções/duplicações de menos de 50Kb de forma confiável. Estas novas plataformas podem detectar uma série de alterações que não seriam detectadas pelas antigas plataformas.

Porém, somente o aumento da densidade das sondas nem sempre é a solução mais eficaz e novas plataformas cada vez mais tendem a serem mais direcionadas para determinadas investigações. Assim, os exames diagnósticos atuais, com frequência, utilizarão plataformas específicas para a aplicabilidade para a qual ela se destina (deficiência intelectual, câncer, etc.).

6. 10 Perspectivas

A opção pelo CGH *array* como primeiro teste a ser usado, em detrimento especialmente do cariótipo tradicional, é consenso por muitos grupos de estudos que investigam dismorfologias, malformações, deficiência intelectual idiopático (com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes), atraso no desenvolvimento (com ou sem traços dismórficos ou sindrômicos marcantes), autismo, entrem outros. (AHN *et al.*, 2010; ARADHYA, MANNING, SPLENDORE, & CHERRY, 2007; KIRCHHOFF *et al.*, 2001; MANNING & HUDGINS, 2010; MILLER *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2011; WINCENT *et al.*, 2011).

A tendência é que cada vez mais a comunidade médica indique o exame de CGH *array* como primeira conduta na investigação genética. No estado de Santa Catarina, o SUS disponibiliza 7 exames mensais de CGH *array*. Este estudo específico para esse estado se soma aos internacionais para destacar a importância deste exame, junto a projetos de saúde pública, como um estímulo ao aumento no oferecimento do mesmo através do SUS.

Conflito de interesse

A co-orientadora Msc. Ingrid Tremel Barbato é sócia-proprietária do Laboratório de Genética Humana Neurogene.

7. CONCLUSÕES

Na amostra estudada, foram encontrados 30,32% de resultados alterados nos exames de CGH *array*, que contribuíram de forma efetiva para o diagnóstico dos pacientes. Desconsiderando os pacientes com resultado positivo que foram incluídos por apresentarem cariótipo alterado, 24,10% dos exames de CGH *array* mostraram alterações.

A principal indicação clínica de cada paciente (a morbidade principal de cada paciente) que levou os médicos a solicitarem o exame de CGH *array* foi: deficiência intelectual para 70,49% dos pacientes, ADNPM para 7,37% (em pacientes com menos de 5 anos), Autismo e outros (22,13%).

Considerando as várias indicações clínicas, ou seja, todas as morbidades apresentadas por cada paciente (geralmente duas ou mais por paciente) para realizar o exame de CGH *array* em indivíduos ainda não classificados em uma síndrome definida foram: o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (81,15%), dificuldade de aprendizado (72,95%) e as características dismórficas (54,10% face e 26,23% membros).

Observando os exames de CGH *array* alterados, a principal indicação clínica de cada paciente (a morbidade principal de cada paciente) que levou os médicos a solicitarem o exame de CGH *array* foi: deficiência intelectual para 70,27% dos pacientes, ADNPM para 18,91% (em pacientes com menos de 5 anos), Autismo e outros (10,81%).

Dentre as várias indicações clínicas (geralmente duas ou mais por paciente) dos exames de CGH *array* alterados destacaram-se: deficiência intelectual leve (46,42%), hiperatividade (46,15%), dismorfias de face (43,93%) e membros (43,75%) e dificuldade motora (40,47%).

Houve diferenças nos resultados dos exames, onde pacientes em que ocorriam traços dismórficos ou sindrômicos marcantes obtiveram um maior número de alterações (43,93%) em relação aos sem dismorfias (14,28%).

Dos 37 resultados alterados (deleção e duplicação) de CGH *array*, as principais alterações encontradas foram: 15q11.2-q13 (9,09%), 9p24.3(6,81%), 1p36 (6,81%), 5p15 (4,54%), 7q31.32-q33 (4,54%), 17p11.2 (4,54%), 22q11.21 (4,54%).

Este estudo mostrou um maior número de resultados de exame de CGH *array* alterados (30,32%) quando comparados com a literatura internacional (15-20%).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. W.; MANN, K.; WALSH, S.; SHEHAB, M.; HOANG, S.; DOCHERTY, Z.; MOHAMMED, S.; *et al.* Validation and implementation of *array* comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics*, v. 3, p. 1-9, 2010.

Alterações Genéticas Submicroscópicas: Parte I. *Projeto Diretrizes*, p. 1–15, 2011.

ARADHYA, S.; MANNING, M. A.; SPLENDORE, A.; CHERRY, A. M. Whole-Genome *array*-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features, *American Journal of Medical Genetics*, v. 143A, n. 13, p. 1431–1441, 2007.

BEAUDET, A. L. The utility of chromosomal microarray analysis in developmental and behavioral pediatrics. *Child Development*, v. 84, n. 1, p. 121–132, 2013.

BEJJANI, B. A.; SHAFFER, L. G. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, n. 1, p. 71–86, 2008.

CARLSON, J. J.; HENRIKSON, N. B.; VEENSTRA, D. L.; RAMSEY, S. D. Economic analyses of human genetics services: A systematic review. *Genetics in Medicine*, v. 7, n. 8, p. 519–523, 2005.

CHEUNG, S. W.; SHAW, C. A.; SCOTT, D. A.; PATEL, A.; SAHOO, T.; BACINO, C. A.; PURSLEY, A.; *et al.* Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics, *American Journal of Medical Genetics*, v. 143A, n. 1686, p. 1679–1686, 2007.

CLIMENT, J.; GARCIA, J. L.; MAO, J. H.; ARSUAGA, J. MINIREVIEW/ MINISYNTHESIS. Characterization of breast cancer by *array* comparative genomic hybridization 1, *Biochemistry and Cell Biology*, n. 85, v. 4, p. 497-508, 2007.

DARILEK, S.; WARD, P.; PURSLEY, A.; PLUNKETT, K.; FURMAN, P.; MAGOULAS, P.; PATEL, A.; *et al.* Pre and postnatal genetic testing by *array*-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, v.10, n. 1, p. 13–18, 2008.

DE VRIES, B. B. A.; WINTER, R.; SCHINZEL, A.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 6, p. 385–398, 2003.

DE VRIES, B. B.; WHITE, S. M.; KNIGHT, S. J.; REGAN, R.; HOMFRAY, T.; YOUNG, I. D.; SUPER, M.; *et al.* Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *Journal of Medical Genetics*, v. 38, n. 3, p. 145–150, 2001.

DETH, R. C. Genomics, intellectual disability, and autism. *The New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 23, p. 2231–2232, 2012.

DI BARTOLO, D. L.; EL NAGGAR, M.; OWEN, R.; SAHOO, T.; GILBERT, F.; PULJAAL, V. R.; MATHEW, S. Characterization of a complex rearrangement involving duplication and deletion of 9p in an infant with craniofacial dysmorphism and cardiac anomalies. *Molecular Cytogenetics*, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2012.

EVANGELIDOU, P.; ALEXANDROU, A.; MOUTAFI, M.; IOANNIDES, M.; ANTONIOU, P.; KOUMBARIS, G.; KALLIKAS, I.; *et al.* Implementation of high resolution whole genome *array* CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature, *BioMed Research International*, v. 2013, p. 14, 2013.

GAJECKA, M.; MACKAY, K. L.; SHAFFER, L. G. Monosomy 1p36 Deletion Syndrome, *American Journal of Medical Genetics* v. 356, p. 346–356, 2007.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo 2010*. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_preliminares_amostra/default_resultados_preliminares_amostra.shtm. Acesso em 20 de Julho de 2013.

JOHNSON, J.; HAAG, M.; BEISCHEL, L.; MCCANN, C.; PHILLIPS, S.; TUNBY, M.; HANSEN, J.; *et al.* “Deletion rescue” by mitotic 11q uniparental disomy in a family with recurrence of 11q deletion Jacobsen syndrome. *Clinical Genetics*, n. 9, p.1–5, 2013.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J. W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative Genomic Hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, v. 258, n. 5083, p. 818-821, 1992.

KANG, S.-H. L.; SCHEFFER, A.; OU, Z.; LI, J.; SCAGLIA, F.; BELMONT, J.; LALANI, S. R.; *et al.* Identification of proximal 1p36 deletions using *array*-CGH: a possible new syndrome. *Clinical Genetics*, v. 72, n. 4, p. 329–338, 2007.

KIRCHHOFF, M.; ROSE, H.; LUNDSTEEN, C. High resolution Comparative Genomic Hybridisation in clinical cytogenetics. *Journal of Medical Genetics*, v. 38, n. 11, p. 740–744, 2001.

KOWALCZYK, M.; TOMASZEWSKA, A.; PODBIOŁ-PALENTA, A.; CONSTANTINOU, M.; WAWRZKIEWICZ-WITKOWSKA, A.; KOWALSKI, J.; KAŁUŻEWSKI, B.; *et al.* Another rare case of a child with de novo terminal 9p deletion and co-existing interstitial 9p duplication: clinical findings and molecular cytogenetic study by *array*-CGH. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 139, n. 1, p. 9–16, 2013.

KREPISCHI-SANTOS, A. C. V.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; JEHEE, F. S.; PASSOS-BUENO, M. R.; KNIJNENBURG, J.; SZUHAI, K.; SLOOS, W.; *et al.* Whole-genome *array*-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 115, n. 3-4, p. 254–261, 2006.

KRISTOFFERSEN, K. E. Speech and language development in cri du chat syndrome: a critical review. *Clinical Linguistics & Phonetics*, v. 22, n. 6, p. 443–457, 2008.

LEE, C. G.; PARK, S.-J.; YIM, S.-Y.; SOHN, Y. B. Clinical and cytogenetic features of a Potocki-Lupski syndrome with the shortest 0.25Mb microduplication in 17p11.2 including RAI1. *Brain & Development*, v. 35, n. 7, p. 9–13, 2012.

LEE, C.; IAFRATE, A. J.; & BROTHMAN, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature Genetics*, v. 39, n. 7 Suppl, p. S48–54, 2007.

LIANG, J.; SHIMOJIMA, K.; YAMAMOTO, T. Application of *Array*-based Comparative Genome Hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatrics & Neonatology*, v. 49, n. 6, p. 213–217, 2008.

LICHTENBELT, K. D.; KNOERS, N. V. A. M.; SCHURING-BLOM, G. H. From karyotyping to *array*-CGH in prenatal diagnosis. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 135, n. 3-4, p. 241–50, 2011.

LINHARES, N. D.; SVARTMAN, M.; VALADARES, E. R. Diagnóstico citogenético de pacientes com deficiência intelectual idiopático. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.48, n. 1, p. 33–39, 2012.

MACHADO, I. N. *Detecção de instabilidade genômica por Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (CGH array) em fetos dismórficos*. 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2010.

MANNING, M.; HUDGINS, L. *Array*-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, v. 12, n. 11, p. 742–745, 2010.

MATTINA, T.; PERROTTA, C. S.; GROSSFELD, P. Jacobsen Syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 4, p. 1-9, 2009.

MICHAELOVSKY, E.; FRISCH, A.; CARMEL, M.; PATYA, M.; ZARCHI, O.; GREEN, T.; BASEL-VANAGAITE, L.; *et al.* Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Medical Genetics*, v. 13, n. 1, p. 122, 2012.

MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental

disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics*, v.86, n. 5, p. 749–764, 2010.

MOHAPATRA, G.; SHARMA, J.; YIP, S. Array CGH in brain tumor. *Array Comparative Genomic Hybridization: Protocols and Applications*, v. 973, p. 325–338, 2013.

MOOHEAD, M; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W.J.; BATTISP, D. M.; HUNDERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, v. 20, p. 613-616, 1960.

PARK, S.-J.; JUNG, E. H.; RYU, R.-S.; KANG, H. W.; KO, J.-M.; KIM, H. J.; CHEON, C. K.; *et al.* Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular Cytogenetics*, v. 4, n. 1, p. 12, 2011.

PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*, v. 20, n. 2, p. 207–211, 1998.

PITUCH, K. A.; GREEN, V. A; DIDDEN, R.; WHITTLE, L.; O'REILLY, M. F.; LANCIONI, G. E.; SIGAFOOS, J. Educational Priorities for Children with Cri-Du-Chat Syndrome. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*, v. 22, n. 1, p. 65–81, 2010.

POPOWSKI, T.; MOLINA-GOMES, D.; LOEUILLET, L.; BOUKOBZA, P.; ROUME, J.; VIALARD, F. Prenatal diagnosis of the duplication 17p11.2 associated with Potocki-Lupski syndrome in a foetus presenting with mildly dysmorphic features. *European Journal of Medical Genetics*, v. 55, n. 12, p. 723–726, 2012.

PRASAD, A.; MERICO, D.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; WEI, J.; LIONEL, A. C.; SATO, D.; RICKABY, J.; *et al.* A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. *G3: Genes, Genomes, Genetic*, v. 2, n. 12, p. 1665–1685, 2012.

RAUCH, A.; RÜSCHENDORF, F.; HUANG, J.; TRAUTMANN, U.; BECKER, C.; THIEL, C.; JONES, K. W.; REIS, A.; NÜRNBERG, P. Molecular karyotyping using an SNP array for genome wide genotyping. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 12, p. 916-922, 2004.

ROGOWSKI, W. Genetic screening by DNA technology: A systematic review, *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, v. 22, n. 3, p. 327–337, 2006.

ROSENBERG, C.; KNIJNENBURG, J.; BAKKER, E.; VIANNA-MORGANTE, A M.; SLOOS, W.; OTTO, P. A.; KRIEK, M.; *et al.* Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 2, p. 180–186, 2006.

SAGOO, G. S.; BUTTERWORTH, A. S.; SANDERSON, S. *Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, v. 1, n. 3, p. 139–146, 2009.

SCHOUTEN, J. P.; MCELGUNN, C. J.; WAAIJER, R.; ZWIJNENBURG, D.; DIEPVENS, F.; PALS, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.

SHAFFER, L. G. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in Medicine*, v. 7, n. 9, p. 650–654, 2005.

SHAIKH, T. H.; GAI, X.; PERIN, J. C.; GLESSNER, J. T.; XIE, H.; MURPHY, K.; HARA, R. O.; *et al.* High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: A data resource for clinical and research applications, *Genome Research*, v. 19, p. 1682–1690, 2009.

SHAW-SMITH, C. Microarray based comparative genomic hybridisation (*array-CGH*) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *Journal of Medical Genetics*, v. 41, n. 4, p. 241–248, 2004.

SHOUKIER, M.; KLEIN, N.; AUBER, B.; WICKERT, J.; SCHRÖDER, J.; ZOLL, B.; BURFEIND, P.; *et al.* *Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? Clinical Genetics*, v. 83, v. 1, p. 53–65, 2013.

SIGGBERG, L.; ALA-MELLO, S.; JAAKKOLA, E.; KUUSINEN, E.; SCHUIT, R.; KOHLHASE, J.; BÖHM, D.; *et al.* *Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. American Journal of Medical Genetics. Part A*, v. 152A, n. 6, p. 1398–410, 2010.

STANKIEWICZ, P.; PURSLEY, A. N.; CHEUNG, S. W. Challenges in clinical interpretation of microduplications detected by *array CGH* analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, v. 152A, n. 5, p. 1089–100, 2010.

TRASK, B. J. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, v. 7, n. 5, p. 149-154, 1991.

VELTMAN, J.A. Genomic microarrays in clinical diagnosis. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 18, n. 6, p. 598-603, 2006.

TRIFIRO, G.; LIVIERI, C.; BOSIO, L.; GARGANTINI, L.; CORRIAS, A.; POZZAN, G.; CRINO, A. Neonatal hypotonia: don't forget the Prader-Willi syndrome. *Acta Paediatrica*, v. 92, n. 9, p. 1085–1089, 2003.

WILLIAMS, N.M.; ZAHARIEVA, I.; MARTIN, A.; LANGLEY, K.; MANTRIPRAGADA, K.; FOSSDAL, R.; *et al.* Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *The Lancet*, v. 376, n. 9750, p. 1401-1408, 2010.

WINCENT, J.; ANDERLID, B.-M.; LAGERBERG, M.; NORDENSKJÖLD, M.; SCHOUMANS, J. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. *Clinical Genetics*, v. 79, n. 2, p. 147–157, 2011.

XU, J.; CHEN, Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *American journal of medical genetics. Part C*, v. 117C, n. 1, p. 15–24, 2003.

ANEXO I

FICHA CLÍNICA DE PACIENTE ENCAMINHADO PARA CGH ARRAY

Número:

Faixa etária do Paciente:

Sexo: () Masculino () Feminino

Etnia:

Estatura:

Motivo do Encaminhamento:

Resultado Cariótipo () Normal () Alterado. Qual:

Resultado CGH *array* () Normal () Alterado. Qual:

Plataforma CGH *array* utilizada: () 44K () 60K

Presença conhecida de outros casos na família () Sim () Não

Ataxia () Presente () Ausente

Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor (abaixo de 5 anos)

() Presente () Ausente

Autismo () Presente () Ausente

Dificuldade de Aprendizado () Sim () Não

Deficiência Intelectual () Leve () Moderada () Severa

Dificuldade Motora () Presente () Ausente

Convulsões () Presente () Ausente

Frequência: () Uma única vez ()

Gravidade:

Dismorfias

Face () Ausente () Presente

() Sutil () Marcante

Cabeça () Ausente () Presente

() Microcefalia () Macrocefalia () Outro

Membros () Ausente () Presente

Qual: _____

Mãos () Ausente () Presente

() Polidactilia

() Braquidactilia

() Sindactilia

() Outro _____

Pés () Ausente () Presente

() Polidactilia

() Braquidactilia

() Sindactilia

() Outro _____

Cabelo () Ausente () Presente

Qual:

Pele () Ausente () Presente

Qual:

Outras Observações Importantes:

ANEXO II

Página 1 de 4



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 019/2013

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

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

OBJETIVOS

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

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

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

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

Específicos:

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

SUMÁRIO DO PROJETO

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

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

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

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

JUSTIFICATIVA

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

METODOLOGIA

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

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

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

13. PROTOCOLO DE PESQUISA – OK

14. ORÇAMENTO – Adequado.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) – Adequado*

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

Os médicos participantes também assinarão um TCLE.

PARECER FINAL

APROVADO

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


 Dra. Juçella Maria Guedert
 Secretária Executiva do
 CEP - HIJG
 Vanessa Borges Platt
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HIJG.

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

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

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