

# UFBA

Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde



**CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS**

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS)  
EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO  
AUTISTA NA CIDADE DE SALVADOR (BA)**

**Salvador-Bahia  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PROCESSOS INTERATIVOS DOS  
ÓRGÃOS E SISTEMAS**



**CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS**

**ESTUDOS DE VARIAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS) EM  
PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA NA  
CIDADE DE SALVADOR (BA)**

Salvador-Bahia

2019

**CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS**

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS) EM  
PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA NA  
CIDADE DE SALVADOR (BA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho.

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a) Maria Betânia Pereira Toralles.

Salvador-Bahia  
2019

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Jesus, Camila Capinam Pereira de  
Estudo de Variações de Número de Cópias (CNVs) em Pacientes com  
Transtorno do Espectro Autista na cidade de Salvador (BA). / [Manuscrito].  
Camila Capinam Pereira de Jesus - Salvador, 2019.  
83f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Betânia Pereira Toralles.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de  
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos  
Interativos dos Órgãos e Sistemas. Salvador, 2019.

1. Transtorno do espectro autista. 2. Autismo. 3 Variação no número  
de

cópias. 4. Microarray. 5. Rede de genes. I. Carvalho, Acácia Fernandes  
Lacerda de. II. Toralles, Maria Betânia Pereira. III. Universidade Federal da  
Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas IV. Título

CDD – 616. 892 2 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS

ESTUDO DE VARIAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS) EM PACIENTES COM  
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Salvador, Bahia, 19 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

PROFA DRA ACÁCIA FERNANDES LACERDA DE CARVALHO (Universidade Federal da Bahia)

---

PROFA DRA MARIA JOSÉ SPARÇA SALLES (Universidade Estadual de Londrina)

---

PROF DR EDSON DELGADO RODRIGUES (Universidade do Estado da Bahia)

Dedico esse trabalho a minha família, meus pais e meus irmãos por sempre me apoiarem e por estarem sempre ao meu lado e aos pais e pacientes com Transtorno do Espectro Autista.

## AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de trabalho tenho muito a agradecer. Foram inúmeras pessoas que entraram em minha vida e contribuíram, de forma crucial, para cada resultado obtido em todas as áreas, pessoais ou profissionais, cuja culminância é a conclusão deste trabalho.

Agradeço primeiramente a DEUS, pois sem Ele nada existiria, nem teria sentido. Ele me deu forças, me guiou e cuidou de mim por toda a minha vida.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Acácia, que me acolheu em seu laboratório quando decidi trabalhar na área de genética e me deu todo apoio, me ensinou muito sobre a citogenética e foi fundamental no meu crescimento pessoal, por ser um exemplo de profissionalismo e extrema generosidade, sempre disponível para ajudar, esclarecer e sempre muito compreensiva.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Maria Betânia Pereira Toralles, minha coorientadora, por ter disponibilizado o laboratório DNA para que eu pudesse desenvolver meu trabalho, oferecendo todo o apoio necessário.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Renata Leite pelo carinho, pela atenção e pelos conselhos valiosos. E ainda por ter sido minha primeira professora de genética em 2008, despertando-me o interesse por essa área tão encantadora.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Lília Azevedo pelo carinho, pelos ensinamentos, bem como por me despertar para o lado social da genética, sempre presente em seus projetos.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Maria José Sparça pelo seu carinho e acolhimento. No pouco tempo em que nos conhecemos, ela fez uma grande diferença em minha vida por sua gentileza e pelos conselhos valiosos.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Vanessa Cortez pela atenção, pela paciência e pelos ensinamentos sobre a rede de genes.

Agradeço a Mônica Jacobina por todo amor e carinho que me foi dedicado, por estar comigo em todo meu trajeto na citogenética, me ensinando sobre tudo, corrigindo minhas metáfases com “carinha feliz”, me aconselhando, sendo uma grande amiga, irmã e professora.

Agradeço à minha Coordenadora Paula Pitanga, por me acolher no laboratório DNA, pelos ensinamentos e pelo espaço cedido para o desenvolvimento de meu trabalho, oferecendo toda ajuda necessária.

Agradeço a meus amigos da citogenética (DNA) – Layla, Fillipe, Lílian, Neulice, Esmeralda, Gustavo, Cida, Nil, Vanesca, Clóvis – por todo carinho, pela atenção, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e pelos conselhos indispensáveis que vocês me deram desde minha chegada e sempre.

Agradeço ao Laboratório DNA pelo espaço cedido e pelo apoio profissional.

Agradeço a meus pais, Vanda e Fernando, por tudo, desde meu nascimento, minha trajetória até chegar aqui e as próximas também, pelo amor e apoio imensuráveis, pela presença constante, pela direção, aconselhamento e paciência. Agradeço muito a Deus por vocês serem meus pais.

Agradeço à minha irmã Emily por ser a melhor irmã que eu poderia ter, pelo amor, por ser minha amiga, por me ouvir, pela paciência, por ser minha cúmplice em tudo. A meu irmão Juninho, por ser o melhor irmão que eu poderia ter, por ser meu amigo, pela atenção, por me ajudar sempre e pela cumplicidade.

Aos amigos do LGHM por fazerem parte da minha formação e pelo carinho e atenção.

Ao Pastor Thiago e à sua esposa Camila, por todo ensinamento, através das reuniões ou pessoalmente, pelas orações e por cada palavra que me foi dada e revelada pelo Espírito Santo, que muito contribuiu para a minha edificação e formação pessoal.

Agradeço a meus colegas de Pós-Graduação, principalmente a Marina, Taiane e Paula, pela amizade, cumplicidade e união.



Agradeço aos funcionários do PIOS – Carlos, Célia, Tarcísio e Alisson – por toda atenção e ajuda.

Agradeço à Pós-Graduação pela oportunidade de realizar e desenvolver meu projeto.

Agradeço à UFBA pela oportunidade de formação profissional, crescimento e aquisição de conhecimento que foram indispensáveis para este momento de minha vida.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho. Meu imenso agradecimento!

JESUS, C.C.P. Estudo de Variações de Número de Cópias (CNVs) em Pacientes com Transtorno do Espectro Autista na cidade de Salvador (BA). [dissertação]. Salvador: Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; 2019. 92f.

## RESUMO

**Introdução:** O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um grupo de condições caracterizadas por alterações no comportamento social, na comunicação e na linguagem e por um repertório restrito, estereotipado e repetitivo. Por ter se tornado cada vez mais presente em nossa realidade mundial, descobrir as causas do desenvolvimento desse transtorno é cada vez mais importante. O TEA tem origem multifatorial, sendo os fatores genéticos associados a variações no número de cópias (CNVs), uma das vertentes que tem sido objeto de estudo para buscar elucidar os casos idiopáticos. **Objetivo:** Estudar as CNVs encontradas em pacientes com TEA, buscando identificar genes que expliquem sua etiologia. **Materiais e Métodos:** A amostra foi por conveniência, não probabilística. Foram analisados 80 pacientes no período de 01 de maio a 15 de outubro de 2019. As CNVs encontradas foram analisadas nos bancos públicos de CNVs, e os genes foram avaliados no banco de dados do *site* STRING e do *site* SFARI. **Resultados:** Foram observados 20 casos alterados, sendo 7 CNVs patogênicas e 13 CNVs de significado incerto (VOUS). **Conclusão:** A análise das CNVs, com base no STRING e no SFARI permitiu identificar genes associados ao TEA e reclassificar as CNVs VOUS quanto à sua relação com o TEA.

**Palavras-chave:** Transtorno do espectro autista. Autismo. Variação no número de cópias. Microarray. Rede de genes.

JESUS, C.C.P. Copy Number Variation (CNV) study in patients with Autism Spectrum Disorder in the city of Salvador (BA). [Dissertation]. Salvador: Postgraduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia; 2019. 92p.

## ABSTRACT

**Introduction:** Autism Spectrum Disorder (ASD) is a group of conditions characterized by changes in social behavior, in communication and in language, and a restricted, stereotyped and repetitive repertoire. As it has become increasingly present in our world's reality, discovering this disorder's development causes is increasingly important. ASD has a multifactorial origin, with genetic factors associated with copy number variations (CNVs), one of the aspects that have been the study's object in order to elucidate idiopathic cases. **The Objective:** To study the CNVs found in patients with ASD, seeking to identify genes that explain their etiology. **Materials and Methods:** A convenience sampling, a nonprobability sampling was used. Eighty patients were analyzed from May 1 to October 15, 2019. The CNVs found were analyzed in the public CNVs banks, and the genes were evaluated in the STRING and SFARI databases. **Results:** Twenty altered cases were observed, in which 7 CNVs were pathogenic and 13 CNVs were of uncertain significance (VOUS). **Conclusion:** The CNVs analysis, based on STRING and SFARI, allowed to identify genes associated with ASD and to reclassify CNVs VOUS regarding their relationship with ASD.

**Keywords:** Autism spectrum disorder. Autism. Copy Number Variation. Microarray. Gene network.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Rede Proteica com os genes associados ao TEA encontrados na amostra	50
-----------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Casos com CNVs patogênicas ou VOUS	39
<b>Tabela 2</b>	Genes associados ao TEA presentes nas CNVs e na Rede STRING e suas respectivas classificações de acordo com cada paciente	51
<b>Tabela 3</b>	Genes encontrados nas análises e sua classificação de acordo com o SFARI-gene	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACGM – American College of Medical Genetics

AGP –Autism Genome Project

CID –Código Internacional de Doenças

CMA – Microarranjos cromossômicos

CNV – Copy Number Variations

DI – Deficiência intelectual

DSM-I – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 1ª Edição

DSM-II – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 2ª Edição

DSM-III – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 3ª Edição

DSM-IV – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4ª Edição

DSM-V: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª Edição

ICARE – International Collaboration for Autism Registry Epidemiology

ISCA – International Standard Cytogenomic Array

LCR – Locus control regions

NAHR – Recombinação homóloga não alélica

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNP – Single Nucleotide Polymorphism-array

SNV – Single-Nucleotide Variant

TEA – Transtorno do espectro autista

TID – Transtornos invasivos do desenvolvimento

VOUS – Variantes de significado incerto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	19
3.1	<b>HISTÓRICO</b>	20
3.2	CAUSAS DO TEA	22
3.3	COPY NUMBER VARIATIONS (CNVS)	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	35
4.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA	35
4.4	COLETA DE DADOS	35
4.5	ANÁLISES DE CNVS	36
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	38
5.1	ANÁLISE DAS CNVS PATOGÊNICAS	40
5.1.1	Paciente 1	40
5.1.2	Paciente 2	40
5.1.3	Paciente 3	41
5.1.4	Paciente 4	41
5.1.5	Paciente 5	42
5.1.6	Paciente 6	42
5.1.7	Paciente 7	43
5.2	ANÁLISE DAS CNVS VOUS E SUBCLASSIFICAÇÃO: PROVAVELMENTE BENIGNA, PROVAVELMENTE PATOGÊNICA OU SEM SUBCLASSIFICAÇÃO, A PARTIR DA ANÁLISE DA REDE DE GENES	44
5.2.1	Paciente 8	44
5.2.2	Paciente 9	44
5.2.3	Paciente 10	45
5.2.4	Paciente 11	45
5.2.5	Pacientes 12 e 13	46

5.2.6	Paciente 14	46
5.2.7	Paciente 15	47
5.2.8	Paciente 16	48
5.2.9	Paciente 17	48
5.2.10	Paciente 18	49
5.2.11	Paciente 19	49
5.2.12	Paciente 20	49
5.3	REDE PROTÉICA STRING – GENES TEA	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	53
<b>7</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b>	62
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	63
	<b>REFERÊNCIAS</b>	64
	APÊNDICE A: Ficha Clínica do Projeto	74
	APÊNDICE B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
	APÊNDICE C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsável pelo menor e/ou Adulto incapaz	78
	APÊNDICE D: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	81
	ANEXO A: Ficha clínica – Laboratório DNA	83
	ANEXO B: Parecer Consubstanciado – Aprovação CEP/ICS	88



## 1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) tem sido um distúrbio cada vez mais frequente no mundo. Por sua amplitude característica, exibe um espectro bem variado de expressões fenotípicas em cada um dos pacientes, de forma bem diferente. O crescimento do número de casos de TEA, principalmente do transtorno de caráter idiopático, tem elevado o número de pesquisas em busca da elucidação desses casos. As causas genéticas têm sido a primeira linha de pesquisa para compreender como o TEA se desenvolve no indivíduo. Dentre a procura por alterações genéticas, as CNVs têm sido frequentemente estudadas, principalmente aquelas que apresentam genes envolvidos com funções sinápticas ou desempenham algum papel no desenvolvimento do sistema nervoso.

Ainda se tratando de CNVs, a presença de CNVs VOUS, que apresentam significado incerto, tem despertado muita dúvida sobre até que ponto aquela CNV estaria sendo responsável pelo fenótipo exibido. Diante desse questionamento, o estudo dos genes presentes nessas CNVs, através de rede de genes (redes proteicas complexas) pode ajudar a nortear a ressignificação dessa CNV ambígua.

Neste trabalho, buscou-se estudar as CNVs encontradas em pacientes com TEA de etiologia desconhecida em um grupo de pacientes da cidade de Salvador (BA), bem como analisar as CNVs VOUS através da rede de genes para observar as interações gênicas, identificando os genes associados ao TEA.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar CNVs encontradas em pacientes com TEA, de etiologia desconhecida, em um grupo de pacientes na cidade de Salvador/Ba.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar as CNVs classificadas como de significado incerto (VOUS) e patogênicas, identificadas nos pacientes com TEA.
- Analisar a interação entre os genes através de redes complexas.
- Identificar genes associados ao TEA nas CNVs encontradas, contribuindo com a construção de painéis.
- Subclassificar as VOUS como provavelmente patogênica, provavelmente benigna ou sem subclassificação, a partir da análise de rede de genes.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

O transtorno do espectro autista (TEA) é constituído de um grupo de condições caracterizadas por alteração no comportamento social, na comunicação e na linguagem e por um repertório restrito, estereotipado e repetitivo de interesses e atividades<sup>1</sup>. Os sinais aparecem logo nos três primeiros anos de vida, permanecendo até a idade adulta<sup>2</sup>. Os indivíduos acometidos por esse transtorno podem apresentar alto comprometimento intelectual, bem como altas habilidades cognitivas.<sup>1</sup>

O TEA tem se mostrado cada vez mais constante e presente em nossa realidade mundial. Segundo estimativa da OMS (Organização Mundial da Saúde), esse transtorno aflige 1 em cada 160 crianças no mundo, podendo a prevalência global ser bem maior, uma vez que, em países de baixa e média renda, esse dado permanece ainda desconhecido devido à escassez de estudos epidemiológicos efetivos. O acesso a melhores condições de saúde tem permitido rapidez no diagnóstico, bem como projetos de sensibilização do público em geral acerca do TEA, o que tem tornado possível a percepção desse crescimento global nos últimos 50 anos.<sup>1</sup>

No Brasil, ainda são escassos os estudos epidemiológicos sobre o TEA. Só foram encontrados 3 estudos que abordam esse tema: o estudo piloto realizado na cidade paulista de Atibaia<sup>3</sup>, uma dissertação de mestrado sobre a prevalência do autismo em Santa Catarina<sup>4</sup> e um estudo realizado por Costa e Nunesmaia<sup>5</sup> na região Nordeste. Em um estudo realizado sobre a avaliação da literatura científica brasileira até o ano de 2009, Teixeira et al. encontraram somente 03 artigos voltados para epidemiologia brasileira do autismo. Em contrapartida, no mesmo período, foram observados 560 artigos internacionais com desenho epidemiológico.<sup>6</sup>

No estudo desenvolvido na cidade de Atibaia, em São Paulo, foi encontrada uma prevalência de 27,2/10.000, sendo considerada uma frequência baixa para uma população numerosa. Dentre as hipóteses levantadas, acredita-se que o diagnóstico tardio e o acesso limitado aos serviços de saúde tenham interferido no valor real desse dado, mostrando que mais estudos são necessários para ajudar a elucidar lacunas ainda existentes sobre o TEA no Brasil.<sup>3</sup>

Sendo essa prevalência mundial tão expressiva, o aumento da incidência do TEA tem levantado muitos questionamentos acerca de sua etiologia, sendo fatores genéticos e

ambientais indicados como principais causas para o desenvolvimento do TEA. Dentre os fatores genéticos do TEA, a epigenética, genes envolvidos em funções sinápticas, bem como *copy number variation* (CNVs) têm sido citados em inúmeros trabalhos científicos como os principais causadores do transtorno do espectro autista.<sup>2</sup>

Ainda no âmbito da genética, o estabelecimento de genes candidatos também vem sendo empregado no processo de pesquisa para uma maior compreensão das causas do TEA. Até o mês de julho de 2019, cerca de 1.089 genes foram associados ao TEA<sup>7</sup>. Anormalidades cromossômicas oferecem uma rápida identificação de regiões candidatas para a descoberta desses genes e, dessa forma, deleções ou duplicações podem determinar regiões de interesse.<sup>8</sup>

Essa alta associação entre TEA e fatores genéticos demanda a necessidade de mais estudos na área da genética médica, buscando entender melhor a etiologia dessa doença. Pesquisa de CNVs utilizando a técnica de microarranjos tem sido apontada com uma ferramenta eficiente na confirmação do diagnóstico do autismo, sendo amplamente utilizada como teste inicial em outros países.<sup>9</sup>

Em estudo realizado por Trakadis e Shevell<sup>10</sup>, analisando 114 crianças que apresentavam atraso do desenvolvimento global, sugeriu ser mais rentável a substituição do cariótipo pelo microarray para tal diagnóstico.

### 3.1 HISTÓRICO

A perda de contato com a realidade, acarretando em uma grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação, foi nomeada “autismo” pela primeira vez em 1911 pelo pesquisador Suíço Paul Eugen Bleuler<sup>11</sup>. Em 1942, Leo Kanner, um psiquiatra austríaco, descreveu esse comportamento social diferente após avaliar 11 crianças que apresentavam incapacidade e (ou) dificuldade de se relacionar com outras pessoas, exibiam movimentos estereotipados e habilidades pouco conhecidas entre o repertório linguístico da criança, como inversão de pronomes e ecolalia (repetição da última palavra ou da fala do outro).<sup>12, 13</sup>

Em 1956, Kanner publicou outro trabalho associando o autismo a um quadro de psicose<sup>12</sup>. Durante as décadas de 50 e 60, surgiram muitos questionamentos acerca das causas do autismo, sobre o que levava essas crianças a apresentarem essa característica

tão peculiar. Por muito tempo, acreditou-se que as crianças autistas eram fruto de pais distantes emocionalmente de seus filhos.<sup>13</sup>

Na década de 60, o autismo começou a ser associado a um transtorno cerebral presente desde a infância, até que, em 1976, Ornitz e Ritvo<sup>14</sup> dissociaram o autismo da atribuição à psicose, relacionando-o a um *deficit* cognitivo associado com um distúrbio comportamental e do desenvolvimento. Em 1978, foram estabelecidos, por Michael Rutter, critérios para a definição do autismo. Em 1980, o DSM-III (Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 3ª Edição) criou uma nova classe de transtornos, denominado Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TIDs) na qual o autismo foi incluído.<sup>12, 15</sup>

Por se tratar de uma manifestação clínica tão diversa e exibir uma variação fenotípica tão grande, tem sido difícil estabelecer um grupo fechado que venha a abranger toda essa variação, o que pode ser verificado nas mudanças de classificação em que o TEA foi inserido pela Associação Americana de Psiquiatria, desde o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 1ª Edição (DSM-I) até a DSM-V (5ª Edição). Na DSM-I, o autismo foi classificado como esquizofrenia infantil, e somente na DSM-III foi reconhecido como um transtorno à parte.<sup>16-20</sup>

Atualmente, com a criação da nova categoria diagnóstica denominada Transtorno do Espectro Autista (TEA) proposta no DSM-V, o TEA está classificado, estabelecendo-se outros critérios clínicos de diagnóstico, com uma subdivisão por níveis, de acordo com o grau de severidade das características apresentadas pelos indivíduos. Os principais critérios clínicos são: déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos e padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses ou atividades. Essas características são classificadas em: Nível 1, necessita suporte; Nível 2, necessita de suporte substancial; e Nível 3, necessita de suporte muito substancial. Tais níveis podem ser interpretados como grau leve, moderado e severo.<sup>20</sup>

Outra alteração – para facilitar o diagnóstico do transtorno e melhorar a codificação para o acesso a serviços de saúde – foi proposta pela OMS através da nova versão do CID (Código Internacional de Doenças). A 11ª Edição foi apresentada na Assembléia Mundial da Saúde em maio de 2019, para o treinamento dos profissionais de saúde, e há previsão para que essa edição entre em vigor em 2022<sup>21</sup>. A nova edição

proposta cria uma única categoria denominada Transtorno do Espectro Autista, Código 6A02, dentro do capítulo 6, Transtornos mentais, comportamentais ou do neurodesenvolvimento, incluindo os diversos diagnósticos do autismo associados ao desenvolvimento intelectual e de linguagem, e Transtorno do Espectro Autista especificado e não especificado. Diferente da CID 10 (10ª edição), na qual o autismo é incluído no Transtorno Global do Desenvolvimento.<sup>22, 23</sup>

### 3.2 CAUSAS DO TEA

Diante dessa característica tão peculiar da exibição de fenótipos tão variados, muito tem se estudado buscando entender as causas do transtorno do espectro autista. O autismo pode ser observado em algumas síndromes como alguns dos sintomas exibidos, como, por exemplo, o X-frágil. Entretanto, indivíduos autistas que não possuem uma síndrome associada têm despertado o interesse dos profissionais de saúde e da comunidade científica na busca do conhecimento etiológico do transtorno.

Atualmente, a etiologia do TEA o apresenta como uma doença de causa multifatorial, sendo o único transtorno neuropsiquiátrico que exibe alto grau de herdabilidade<sup>3, 24, 25</sup>. No trabalho escrito por Bailey et al.<sup>26</sup>, que avaliou o TEA em um grupo de gêmeos monozigóticos, esse transtorno apresenta cerca de 90% de herdabilidade.

Dada a característica multifatorial, muitos fatores genéticos e ambientais podem estar contribuindo para a manifestação clínica do TEA. Muitas teorias surgiram tentando explicar o número de crianças com o TEA. Vários estudos foram realizados tentando estabelecer a relação entre exposição a poluentes atmosféricos, material particulado, pesticidas e outros desreguladores endócrinos, talidomida, lúpus, misoprostol, ácido valpróico, dentre outros fatores ambientais durante os períodos pré, peri e pós-natal. Entretanto, as conclusões obtidas não foram fortemente confirmadas para estabelecer alguma relação.<sup>27, 28</sup>

Outras teorias de ordem ambiental foram surgindo no decorrer dos anos e causaram muito questionamento e polêmicas, como a associação do nascimento de crianças com autismo e vacinas, como a da rubéola e a tríplice viral. Contudo, tais teorias também não apresentaram evidências científicas suficientes para confirmá-las.<sup>29</sup>

Estudos voltados para explicações ambientais estão cada dia mais apresentando evidências sugestivas de que eventos ambientais podem, de alguma forma, mudar o padrão epigenético e, conseqüentemente, modular a expressão gênica de genes que podem estar envolvidos na manifestação do TEA.<sup>27</sup>

A revisão realizada por Ng et al.<sup>28</sup>, buscou avaliar, durante os anos de 2003 a 2013, os principais fatores ambientais que poderiam contribuir para a manifestação clínica do TEA. Dentre os estudos publicados nesse período, foram encontrados, majoritariamente, os de caráter fisiológico e químico. Os estudos que avaliaram os fatores sociais e nutricionais foram em número consideravelmente menor. A exposição a metais pesados foi a suposta causa que mais apresentou estudos, embora a falta de informações sobre o tempo de exposição não oferecesse evidência significativa para a associação. A idade avançada dos pais foi considerada o mais consistente fator fisiológico, seguido do baixo peso ao nascer, prematuridade e complicações durante o período gestacional.

Sandin et al.<sup>30</sup>, estudaram se o avanço da idade materna e paterna está independentemente associado ao risco de TEA. Esse estudo foi uma coorte entre 5 países (Dinamarca, Israel, Noruega, Suécia e Austrália Ocidental), com 30.902 casos de TEA. Foi observado o aumento do risco relativo de TEA para idade avançada de ambos os pais. Entretanto, foi observado também que mães jovens também podem contribuir para o aumento do risco de TEA, e que a idade paterna pode contribuir mais que a idade materna em geral, apoiando a hipótese do ICARE (International Collaboration for Autism Registry Epidemiology), de que a idade avançada de ambos os pais, no momento do nascimento, é independentemente associada ao risco de TEA na prole. O risco observado no trabalho também foi elevado para pais com idades diferentes, em que a diferença entre eles seja maior do que 10 anos.

Do ponto de vista genético, a análise dos cromossomos, de um modo geral, tem indicado várias associações do autismo a alguns deles, sendo os cromossomos 2 e 7 os que apresentam uma ligação mais robusta em autistas com altos déficits de linguagem. Em 1998, o Consórcio Internacional para o Estudo da Genética Molecular do Autismo associou, em um grupo de 56 famílias no Reino Unido, um distúrbio familiar severo de

linguagem à região q31 do cromossomo 7<sup>31</sup>, no qual o gene *RELN* tem sido associado ao autismo.<sup>32, 33</sup>

Em estudo realizado por Costa e Nunesmaia<sup>34</sup>, em 1998, no qual foram avaliados 36 indivíduos autistas de ambos os sexos e pertencentes a famílias diferentes, em 03 regiões do Nordeste do Brasil, foi observada uma proporção maior de autismo em indivíduos do sexo masculino, 03 vezes maior que no sexo feminino, 77,8% e 22,2%, respectivamente. Ainda nesse estudo<sup>34</sup>, foi evidenciada uma recorrência familiar de 11,42%, como é observado em vários trabalhos que apresentam uma taxa de recorrência de 3 a 8%<sup>31, 32</sup>, além de um grau significativo de casamentos consanguíneos, que foi superior ao esperado, confirmando a característica multifatorial da TEA, uma vez que o endocruzamento aumenta a probabilidade de doenças dessa ordem.

Dado o perfil genético apresentado por essa desordem, dentre outras características genéticas, a análise de variações no número de cópias (CNVs) tem sido alvo de vários estudos, uma vez que foram descobertas mutações *de novo*, que não estão presentes nos pais, mas são geradoras de variabilidade genética.<sup>35, 36</sup>

### 3.3 COPY NUMBER VARIATIONS (CNVs)

As CNVs são alterações genômicas com pelo menos 1kb de extensão e envolvem ganhos ou perdas (duplicações ou deleções) quando comparadas ao genoma de referência. Essas variações estão presentes em todos os indivíduos e podem ser CNVs de caráter normal ou patológica.<sup>37, 38</sup>

O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica e a Associação de Patologia Molecular (ACGM) recomendam que as CNVs encontradas sejam nomeadas como “variantes” e sejam classificadas como variante patogênica, provavelmente patogênica, significado incerto (VOUS), provavelmente benigna ou benigna.<sup>39</sup>

Essa classificação, proposta pela ACGM<sup>39</sup>, estabelece como variante benigna a CNV, que não é encontrada em indivíduos com certos fenótipos estabelecidos. Entretanto, ela foi relatada em múltiplas publicações e é repetidamente encontrada na população normal. Para as variantes patogênicas, a CNV é bem documentada como clinicamente significativa em várias publicações, independentemente de a penetrância e a expressividade da CNV serem conhecidas por serem variáveis. As variantes de



significado incerto (VOUS) representam uma categoria ampla de CNVs que não foram relatadas ou, se relatadas, não apresentaram evidências suficientes disponíveis para o seu significado clínico inequívoco. Todas as CNVs que não podem ser classificadas como patogênicas ou benignas estão incluídas nesse grupo.

Diante das CNVs VOUS, com caráter inespecífico, é possível, através da análise proposta por Beata Nowakowska<sup>40</sup>, subclassificá-las sugerindo um possível caminho para auxiliar na interpretação do diagnóstico inconclusivo delas. É sugerida a subclassificação da VOUS como provavelmente patogênica quando essa CNV for descrita previamente em um único paciente, com um fenótipo similar, ou a presença de um gene CNV tem uma função relevante para a razão pela qual o paciente referencia. Provavelmente benigna é a subclassificação indicada para a CNV que não inclui genes relevantes para o fenótipo, mas excede o critério de tamanho. Aquelas CNVs VOUS que não se enquadram em nenhum desses critérios estão inclusas nas CNVs VOUS sem subclassificação, as quais possuem genes, mas não se sabe se esses genes são sensíveis a dosagem, ou pouco se conhece sobre sua função<sup>41</sup>.

A classificação das CNVs exige um profundo e detalhado estudo, o que pode levar a falta de consenso entre os pesquisadores, abrindo espaço para a interpretação médica. Muitas vezes, essa interpretação varia entre os laboratórios, permitindo, em algumas situações, erros de diagnóstico para o paciente.<sup>42</sup>

A associação entre CNVs e pacientes autistas tem apresentado frequências significativas de 8 a 11,6%. Avaliando apenas as mutações *de novo*, em famílias que apresentam um indivíduo afetado, são encontradas frequências que variam entre 5,6 a 10%. Em famílias com mais de um afetado, há variação de 2 a 5,5%, permitindo uma reflexão sobre a possibilidade de existência de alelos de susceptibilidade nos casos de autismo familiares, atuando juntos para modular o risco de autismo.<sup>36, 43</sup>

Exames genômicos para CNVs demonstraram uma ocorrência de 10 a 20% dessas variantes em indivíduos com TEA. As CNVs presentes nos cromossomos 15, 16 e 22, nas regiões q11-q13, p11.2 e q13, foram encontradas em aproximadamente 3 a 5% dos indivíduos afetados. A CNV encontrada no cromossomo 22 apresenta um tamanho que varia entre 100Kb a 9Mb e envolve sempre o gene *SHANK3*, que já foi descrito, em muitos trabalhos, como ligado ao fenótipo autista.<sup>44, 45</sup>

Foram observadas evidências da penetrância incompleta de CNVs: 40% foram detectadas em pacientes autistas que possuíam pais saudáveis<sup>36, 43</sup>. Em estudo realizado com 10 pacientes com TEA, foi observada uma nova mutação no gene *ADNP* (Activity Dependent Neuroprotetor Homebox), presente no cromossomo 20<sup>46</sup>, sob estimativa de mutação em 0,17% dos casos de TEA, o que o incluiu entre os genes mais frequentemente associados ao autismo<sup>36</sup>.

Segundo Geschwind<sup>35, 36</sup>, as CNVs são mais acentuadas em filhos de pais mais velhos. Foi observado que o número de mutações em filhos autistas aumentava conforme a idade paterna fosse maior. A idade materna também influenciou na quantidade de mutações, mas a idade paterna ainda apresentou graus significativos de interferência<sup>36, 47</sup>.

Pesquisas envolvendo as CNVs estão cada vez mais frequentes, e o surgimento de novas tecnologias citogenéticas tem permitido uma rápida identificação de deleções e duplicações cromossômicas<sup>8</sup>. A utilização da técnica de análise em microarranjos detecta ganhos e perdas no DNA associados a alterações cromossômicas desbalanceadas. A hibridação genômica por arranjos de polimorfismos de um único nucleotídeo (*SNP-array*) tem permitido a identificação de CNVs através da hibridação do genoma do paciente a um *chip* com sondas polimórficas para genes específicos. Essa técnica tem trazido muita esperança de contribuir na elucidação dos fatores responsáveis pelo acometimento dos distúrbios do espectro autista.<sup>39</sup>

Durante cerca de 50 anos, a detecção de grandes alterações cromossômicas, como a trissomia do cromossomo 21, era realizada por cariotipagem. Com o passar do tempo e com o surgimento de novas tecnologias, a análise de microarranjos cromossômicos (CMA), se tornou o teste clínico de primeira linha para a detecção de CNVs causadoras de doenças, seguida pelo sequenciamento do exoma para encontrar SNVs e *indels*.<sup>48</sup>

Em muitos países, a utilização da técnica de CMA tem substituído o cariótipo e tem se tornado teste inicial para triagem de pacientes que apresentam doenças ligadas ao neurodesenvolvimento, tais como atraso do desenvolvimento, deficiência intelectual e TEA. A utilização do *microarray* nesses países tem mostrado grande eficiência no entendimento e no diagnóstico de doenças causadas por CNVs. Na contramão desse avanço no alto índice de diagnóstico e detecção, o aparecimento de variantes com

significado incerto (VOUS) tem despertado muitos questionamentos quanto à sua real significância e o quanto essas variantes estão, de fato, contribuindo ou não com a expressão do fenótipo.<sup>42</sup>

Em estudo realizado em 2015, por pesquisadores do Egito, com 30 crianças autistas, buscando identificar alterações cromossômicas no nível do cariótipo, que estivessem associadas ao autismo, não conseguiu detectar alterações nessa resolução, salientando a necessidade de tecnologias mais sensíveis.<sup>49</sup>

A compreensão das VOUS tem se mostrado um desafio, justamente pelo caráter ambíguo que elas podem exibir, uma vez que são encontradas tanto em pacientes afetados quanto na população considerada “normal”. Essas variantes são, em sua maioria, herdadas de pais que não apresentam o mesmo fenótipo estudado, aparentemente “saudáveis” e, muitas vezes, estão associadas a características fenotípicas variáveis, tornando a interpretação clínica desafiadora.<sup>42</sup>

As CNVs podem ser encontradas em todos os cromossomos, com uma ocorrência de de 10 a 20% em pacientes com TEA, sendo que a maioria dessas CNVs são consideradas raras. Através dos exames de diagnóstico, as CNVs *de novo* ou herdadas estavam presentes em até 10% dos casos de autismo. Apesar dessa característica abrangente, estudos sugerem que existem alguns cromossomos que apresentam uma maior suscetibilidade para apresentar essas alterações. Dentre os 23 cromossomos humanos, o cromossomo 16 tem mostrado estar associado a variantes estruturais, deleções e duplicações desequilibradas. A região 16p13.11 possui três intervalos (I, II e III), cada um flanqueado por sequências ricas em repetições de pouca cópia (LCRs), também chamadas de duplicações segmentares. Acredita-se que esses elementos repetitivos aumentem o risco de rearranjos cromossômicos via recombinação homóloga não alélica (NAHR). As deleções na região 16p13.11 são consideradas patogênicas, enquanto a significância de suas duplicações recíprocas ainda está em debate.<sup>42,45, 50- 53</sup>

Por ser uma CNV muito frequente, a duplicação 16p13.11 apresenta penetrância incompleta e expressividade variável. Essa duplicação ocorre através do processo descrito acima (NAHR). Esse processo é altamente observado em pacientes que apresentam desordem do desenvolvimento e TEA. O estabelecimento da associação

entre as manifestações clínicas e as CNVs tem sido um grande desafio entre os estudiosos devido à amplitude dos fenótipos e à diversidade de CNVs. Além disso, na maioria das vezes, a CNV herdada é proveniente de um pai que aparenta ser saudável.<sup>42</sup>

No estudo desenvolvido por El Khattabi et al.<sup>42</sup>, a duplicação de 16p apresentou características mais comuns associadas ao atraso da fala e à dificuldade de aprendizado, TEA e alterações cardíacas na aorta. Diante desses achados, foi possível buscar entender a relação entre os genes afetados pelas CNVs e, dessa forma, foi admissível sugerir, através desses dados, que a duplicação na região 16p13.11 pode ser provavelmente patogênica quando for associada às manifestações clínicas do TEA, à deficiência intelectual e ao atraso do desenvolvimento. Ainda nesse estudo, observou-se também que, em 20 casos dos 31 avaliados, essa duplicação do 16p foi transmitida pela mãe e, em 11 casos, a transmissão foi paterna, apresentando uma possível prevalência de transmissão materna desse tipo de duplicação.

Outra região cromossômica que tem apresentado facilidade para a ocorrência de recombinações homólogas não alélicas, que podem levar a deleções e duplicações recorrentes, é a região 2q13. A CNV encontrada nessa região é uma microdeleção herdada geralmente de pais saudáveis na maioria dos casos, cujo tamanho é de 1,71 Mb. Por muito tempo se acreditou que se tratava de uma CNV com significado incerto; entretanto, dada a grande associação como pacientes com TEA, foi considerada como patogênica, apresentando penetrância variável.<sup>42, 52, 54, 55</sup>

São ainda levantados muitos questionamentos que buscam elucidar o motivo pelo qual os pais de crianças afetadas, que possuem microdeleção em seu genoma, são assintomáticos ou apresentam sintomas leves. Alguns pesquisadores tentaram explicar a possível razão para que essa situação fosse possível, tais como: a) genes diferentes deletados no segmento cromossômico; b) perda de heterozigosidade, que pode revelar um alelo recessivo; c) os pacientes portadores das CNVs podem ter outras CNVs que contribuem ou modificam o fenótipo; d) o fator ambiental pode influenciar na expressão fenotípica. A penetrância incompleta e a expressividade variável são desafios durante o aconselhamento genético.<sup>54,56,57</sup>

O TEA é observado em associação com muitas síndromes, como parte dos sintomas apresentados por elas, mostrando uma grande possibilidade de suscetibilidade

genética compartilhada. Estudos em consórcios têm buscado estabelecer uma relação entre irmãos, e tem sido observado que irmãos mais novos de pacientes com TEA possuem uma taxa de risco para desenvolver TEA maior do que o taxa de 1% da população. Em alguns casos, muitos genes são afetados pela CNVs, Loci abrigando mutações raras, de novo e herdadas. Variações estruturais e SNVs têm mostrado afetar, em sua maioria, genes associados a função sináptica, remodelação da cromatina e sinalização neuronal. Estudos que desenvolvem modelos genéticos sugerem que pelo menos 50% da variância do TEA podem ser provenientes de variações hereditárias comuns. Entretanto, estudos de associação genômica não têm refletido os resultados mostrados nos modelos propostos.<sup>58-60</sup>

Além do caráter multifatorial, o TEA também exibe um caráter multigênico, revelando um fenótipo que nada mais é do que a combinação de variantes raras e comuns, que podem ou não ser herdadas. O modelo do “copo” tem sido proposto para explicar o TEA, um modelo de herança e limiar multifatorial, revelando a combinação de vários fatores, tantos genéticos quanto ambientais, representando maior ou menor risco associado ao TEA.<sup>61</sup>

Hoang et al.<sup>61</sup>, produziram um trabalho com base em sua experiência com aconselhamento genético e na análise de dados dos resultados de exames. Eles propuseram um modelo para a compreensão da manifestação do TEA. Por apresentar um fenótipo amplo, marcado por variações múltiplas de expressão, é possível considerar que, na manifestação clínica do TEA idiopático, fatores ambientais e genéticos, herdáveis ou não herdáveis, agem em conjunto. O modelo do “copo”, derivado do modelo do “jarro”, utilizado para doenças mentais, é o modelo que mais se aproxima de uma explicação mais assertiva da complexidade do TEA, buscando, dessa forma, minimizar os muitos questionamentos sobre seu desenvolvimento.

Esse modelo do “copo” proposto estabelece que cada indivíduo seria representado por um copo, no qual são adicionados fatores genéticos e ambientais e, ao atingir o limite desse copo, o indivíduo manifestaria o TEA. As variantes genéticas (raras, comuns, herdáveis e ou *de novo*) seriam representadas por tamanhos de círculos indicando maior e menor risco para o desenvolvimento do TEA. Esse modelo revela a herança multifatorial presente no TEA, levando em consideração a diferença de gênero

exibida pelo TEA, uma vez que o limiar do copo do sexo feminino é maior do que o do copo masculino. Em resumo, conforme esse modelo, se a quantidade de círculos que forem acrescentados ao copo for pouca e não atingirem a borda, esse indivíduo não é considerado autista, embora seja possível que ele venha a ter filhos com TEA, a depender das contribuições adicionais do parceiro. Entretanto, se o indivíduo chega até o limite do copo, ele pode ser considerado autista. Esse modelo explica facilmente a existência de variantes que podem, de alguma forma, contribuir para a expressão do TEA e podem estar presentes nos pais, que são aparentemente saudáveis.<sup>61</sup>

Ainda neste trabalho, foi possível avaliar as variantes encontradas, sendo observado que algumas delas possuíam uma alta penetrância, evidenciando um risco muito grande para a expressão do TEA. Essas variantes estão presentes em genes associados ao desenvolvimento ou desempenham funções cerebrais (*PTCHDI*, *NRXNI*, *SHANK2*, *CHD8*, *ARID1B*, *SCN2A*, *ADNP*). Outras variantes exibiam risco, embora, sozinhas, não sejam consideradas como fator preponderante para a expressão do TEA.<sup>61</sup>

Em trabalho realizado por Jacquemont et al.<sup>62</sup>, foram utilizados os dados do banco do Signature Genomic Laboratories, sendo analisadas CNVs de 15.585 casos, nos quais estavam disponibilizadas informações sobre o gênero do paciente. Na amostra, foram analisados 9.206 homens e 6.379 mulheres; destes foram observados 1.379 casos de TEA. Nesse estudo foi proposta a possibilidade de haver um modelo de proteção feminino, uma vez que as mulheres que apresentavam TEA possuíam 2 vezes mais CNVs grandes em comparação aos homens, sendo que elas carregavam mais variantes deletérias, ou seja, a carga mutacional para que as mulheres venham desenvolver autismo é muito maior que nos homens, sugerindo, assim, que o cérebro masculino pode ser sensível às alterações mais leves, sendo elas já necessárias para a expressão do fenótipo. Foram observadas também algumas diferenças fenotípicas associadas ao gênero, sendo possível avaliar que as pacientes do sexo feminino que apresentaram o TEA possuíam QI menores, quando comparadas a pacientes do sexo masculino. Analisando o banco de dados, foi possível estabelecer, para esse grupo, uma taxa de 70% de herança materna para as CNVs autossômicas, evidenciando esse limiar mais baixo para o desenvolvimento do TEA para os indivíduos masculinos.

No que tange às técnicas utilizadas para a identificação de variantes, foi realizada uma revisão por Vorstman et al.<sup>63</sup>, mostrando as limitações das técnicas quanto à detecção de CNVs. O *microarray*, apesar de ser altamente sensível, não consegue detectar translocações equilibradas ou inversões. Já o sequenciamento do genoma completo e do exoma revela uma quantidade enorme de informações e achados incidentais. O alto número de dados gerados por esses exames tem esbarrado na falta de conhecimento sobre o que fazer com essa vasta informação para que se possa estabelecer a relevância clínica desses achados, ressignificando a variedade de variantes VOUS, que, até o momento, tem se apresentado como um desafio para os profissionais envolvidos. Dada riqueza de informações contidas nesses exames, se faz necessário avaliar a penetrância e a expressividade dessas variantes, e compreender as comorbidades associadas ao autismo para que, assim, se possa oferecer uma condição de vida melhor para esses indivíduos.

Neste estudo<sup>63</sup>, foi observada a pleiotropia somática das variantes genéticas que possuíam relação com o TEA. Dentre uma série de acometimentos, prejuízo na visão, características craniofaciais, dentição anormal, anormalidades endócrinas, renais e urogenitais, obesidade, epilepsia, ataxia, problemas alimentares e gastrointestinais e defeitos no coração são os eventos que mais apresentam associação com o autismo. Este estudo também evidenciou a necessidade de estudos colaborativos em escala global para uma compreensão maior das variantes, principalmente as VOUS, para auxiliar no aconselhamento genético. O esforço colaborativo para a identificação dos genes de risco contribuiu de forma significativa para o entendimento da neurobiologia do autismo. Outro obstáculo encontrado por esses pacientes é a falta da implementação de políticas que ofereçam acesso a exame de referência, tal como o *microarray* para TEA e a assistência de qualidade para esses indivíduos.

Em análise feita por Pinto et al.<sup>51</sup>, foram observados genes afetados por CNVs *de novo*, ou que possuíam SNV com perda de função. Quando avaliados em rede de funções proteicas, convergiram nas redes relacionadas a sinalização e desenvolvimento neuronal, função sináptica e regulação da cromatina. Ao avaliar o impacto das CNVs raras, *de novo* e herdadas, em 2.446 indivíduos com TEA e seus pais, que fazem parte do Autism Genome Project (AGP), e 2.640 controles, buscando genes associados ao

TEA e identificando as vias comuns para o desenvolvimento das funções biológicas, foi observada grande quantidade de CNVs raras presentes nos indivíduos desse projeto, e uma alta heterogeneidade etiológica. Foram encontrados 36 loci genéticos diferentes para os 82 pacientes que apresentaram CNVs patogênicas, e mulheres apresentando CNVs de alta penetrância. Outra observação significativa diz respeito às deleções associadas ao TEA que prejudicam a função sináptica e os processos de desenvolvimento neurológico, sugerindo que deleções possam ter um impacto maior quando estão associadas a genes com alta expressão no cérebro. E ainda que, em casos de duplicação e sobreposição dos genes *FNRP* e *PSD*, a dosagem alterada desses genes exibe uma suscetibilidade para o TEA.

Um estudo desenvolvido por Woodbury-Smith<sup>58</sup>, buscou identificar as regiões cromossômicas com variantes herdadas que poderiam aumentar o risco para TEA em 28 famílias do Canadá, sequenciando o genoma completo. Nesse trabalho, foram excluídos indivíduos que apresentavam coocorrências médicas, como o X-frágil, esclerose tuberosa, dentre outras relações já conhecidas. Foram selecionadas famílias grandes e com, no mínimo, 3 afetados, e foram aceitas características presentes no amplo espectro do TEA para a identificação do maior número de afetados na família. Foram observadas a heterogeneidade interfamiliar e a intrafamiliar, bem como a necessidade de se identificarem os fatores de risco genético em longas famílias.

Em revisão realizada por Liu e Takumi<sup>64</sup>, foi possível ter uma visão geral do panorama genético do TEA, sendo observado, em outras literaturas, que cerca de 31% dos indivíduos que apresentam TEA também apresentam deficiência intelectual, seguida de outras comorbidades, como convulsões, ansiedade, desordem gastrointestinal e do sono. Ainda nessa revisão, foi observada, em estudos de gêmeos monozigóticos, uma taxa de concordância de 70 a 90% e, entre gêmeos dizigóticos, essa concordância chega somente até 30%, mostrando até que ponto o fator genético tem papel na expressão daquele fenótipo e em que momento o fator ambiental também vai influenciar. Nesse trabalho, foram apresentadas, com base na literatura avaliada, as regiões mais frequentes ou com maior predisposição a apresentar anormalidades associadas ao TEA, tais como 15q11.2-q13.1, 15q13.3 16p11.2, 16p13.3, 2p16.3, 1q21.1, 7q11.23, 3q29,22q11.2, 17p11.2, 17q12, Xq28.



No trabalho desenvolvido por Gaugler et al.<sup>60</sup>, – baseado em um estudo sueco de uma coorte de crianças nascidas entre 1982 a 2007 –, que analisou 14.516 casos de autismo, foi possível observar a incerteza do espectro alélico devido à dominância das variantes raras associadas ao TEA. Entretanto, alguns estudos recentes têm mostrado que variantes comuns, de pequeno efeito, podem ter um impacto preponderante na expressão do fenótipo. No que tange à herdabilidade, acredita-se que ela seja de 50 a 60%, tendo como principal contribuição as variantes comuns, sendo as variantes raras herdadas responsáveis por uma porção muito menor. Ao se falar em herdabilidade no sentido restrito, as variantes raras *de novo*, esse valor é de aproximadamente 52%, uma vez que 80% dos indivíduos portadores de uma CNV *de novo* não seriam afetados se não fossem portadores.

Uma pesquisa qualitativa desenvolvida por Hanish et al.<sup>65</sup>, no Centro Médico da Universidade de Nebraska, nos Estados Unidos, com 20 pais de crianças diagnosticadas com TEA e que foram encaminhadas para fazer testes genéticos, mostrou que a maioria dos pais não tem conhecimento sobre o objetivo, procedimentos e análises dos teste genéticos, ou, se o tem, é limitado. Entretanto eles os consideram benéficos para seus filhos e suas futuras escolhas reprodutivas. A interpretação deles sobre os exames caminha pelas contribuições ambientais e genéticas para compreender o que se passa com os filhos. Uma vez que haja um diagnóstico genético, os pais tendem a acreditar que o TEA é permanente e diminuem a expectativa sobre o prognóstico do filho. Mesmo quando são mostrados os riscos e benefícios, eles tendem a prosseguir com os testes, uma vez que buscam respostas para a situação de seus filhos através deles, mostrando a necessidade e a importância da acessibilidade a esses testes que, em sua maioria, são caros e, muitas vezes, incompreensíveis para o público que não tem conhecimento técnico.

Por não existir, até o presente momento, uma terapia que represente a cura do TEA, os exames genéticos para a investigação do autismo têm trazido uma luz para o aconselhamento genético. Através da descoberta da etiologia do autismo, é possível estabelecer o risco de recorrência, principalmente se for levada em consideração a característica de ser influenciado pelo sexo. Dada essa importância, é necessário um aconselhamento diferenciado para cada caso, levando-se em consideração cada caso, os

contextos psicossociais nos quais a família está inserida, percebendo as respostas dos pais diante das perguntas que norteiam o aconselhamento e utilizando, sempre que possível, ferramentas que facilitem o entendimento dos pais sobre o TEA, de modo a trazer a ressignificação do resultado para aquela família. Mostra-se necessário que os profissionais de saúde adquiram um conhecimento especializado sobre as variantes, para que, dessa forma, possam auxiliar a família no entendimento do resultado genético de seu filho.<sup>61</sup>

A forte associação genética exibida pelo TEA e a escassez de trabalhos desenvolvidos na população brasileira indicam a necessidade de pesquisas que investiguem essas variantes, o que justifica a realização desta pesquisa. Trata-se de um estudo de série de casos, observacional e descritivo, não comparado, de indivíduos com TEA que realizaram análise de microarranjos. O estudo das CNVs encontradas pode auxiliar no entendimento do processo de desenvolvimento neural desses indivíduos acometidos com o TEA

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população estudada neste trabalho é constituída de pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) que realizaram o exame de *microarray* no Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular – DNA.

### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com TEA de etiologia desconhecida que realizarem pesquisa genética através de teste de *microarray*.

### 4.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA

Trata-se de um estudo de série de casos, observacional e descritivo, não comparado. A amostra do presente estudo foi obtida por conveniência e é não probabilística. É constituída de 80 pacientes que já possuíam diagnóstico clínico para transtorno do espectro autista, embora sem causa conhecida e realizaram o exame de *microarray* para análise genética da etiologia do TEA.

### 4.4 COLETA DE DADOS

Foram coletados dados clínicos e genéticos dos pacientes diagnosticados com TEA em ficha específica para a pesquisa (Anexo A).

Os participantes desta pesquisa foram ao DNA – Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular, no período de 01 de maio de 2019 a 15 de outubro de 2019 para realizar o exame de *microarray* solicitado pelos médicos que os acompanham. Nesse momento, foram convidados a participar do estudo e assinaram o TCLE. Nenhum paciente foi submetido a um novo exame de *microarray*. Foi somente solicitada autorização para utilizar os dados genéticos e clínicos do laudo desse exame realizado por eles para o diagnóstico do TEA.

O DNA – Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular, utiliza a plataforma Thermo-Fisher CytoScan 750k para a realização dos exames de diagnóstico de *microarray* – *SNP-array*. Esse exame já foi validado e tem sido amplamente utilizado

no diagnóstico do TEA e dismorfias. A análise de microarray consiste na extração de DNA genômico e reação de *SNP-array*, que, após processamento, passam por um *software* de análise. Nesse *software*, os chips são lidos com o Chromosome Analysis suíte (ChAS, Thermo Fisher).

#### 4.5 ANÁLISES DE CNVs

As CNVs encontradas foram analisadas utilizando-se bancos de dados genéticos públicos específicos: DGV – Database of Genomic Variants; Decipher (<https://decipher.sanger.ac.uk>); OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man (<https://www.omim.org>); Genome Browser on Human, Simons Foundation Autism Research Initiative (<https://www.sfari.org>); e NCBI – Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Os genes encontrados nas CNVs foram analisados através do Banco de Dados STRING versão 11.0, que busca estabelecer uma rede de gene (rede proteica) com as possíveis interações gênicas associadas. As interações estabelecidas pelo banco de dados podem ser diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), através de mecanismos de bioinformática dos organismos e interações conhecidas em outros bancos de dados primários. O STRING cobre, até o momento de construção desta dissertação, 24,6 milhões de proteínas e 5.090 organismos<sup>66</sup>, tendo como fonte principal de dados previsões do contexto genômico e experimentos de laboratórios de alto rendimento, coexpressão conservada, citações de texto automatizadas dos trabalhos nos bancos de dados e conhecimento anterior de bancos de dados reconhecidos internacionalmente.

Foram estabelecidos critérios para avaliação das redes protéicas para 100 genes, sem a utilização do Textiming (ferramenta de análise do STRING) e valor de confiança de 0.7 (alta confiança), para garantir à rede uma maior confiança quanto às possíveis interações. Os genes encontrados nas redes proteicas estabelecidas que possuíssem algum tipo de relação com os processos desenvolvidos no sistema nervoso, em funções sinápticas, entre outros, foram avaliados no banco de dados do site SFARI-Gene da Fundação Simons, internacionalmente conhecida por desenvolver pesquisas acerca do autismo, buscando estabelecer possíveis genes candidatos e CNVs associadas.

O SFARI-gene possui um critério de classificação baseado em evidências, a partir do qual classifica os genes e suas possíveis interações.

- S: Sindrômico – TEA presente em síndromes (ex.: X-Frágil). Quando há evidências de associação com o TEA idiopático, há numeração correspondente à categoria na frente da letra (ex.: 2S)
- Score 1: Categoria 1 – Alta confiança
- Score 2: Categoria 2 – Candidato forte
- Score 3: Categoria 3 – Evidência sugestiva
- Score 4: Categoria 4 – Evidência mínima
- Score 5: Categoria 5 – Hipótese, mas não testada
- Score 6: Categoria 6 – Evidência não suportada

Até o presente momento, menos de 10% dos genes avaliados pelo SFARI se enquadram nas categorias 1 e 2. Para este trabalho, foi admitido o critério de só considerar os genes classificados na categoria 1, 2, 3, 1S, 2S e 3S, por estarem associados ao TEA idiopático.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas da amostra, em geral, foram feitas através do programa Excel.

#### 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo obedeceu às recomendações da Resolução CNS Nº 466 de 12 de dezembro de 2012, para o desenvolvimento de pesquisas com seres humanos.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) – **CAAE:** 97907018.0.0000.5662, e aprovado em 22 de março de 2019.

## 5. RESULTADOS

Neste trabalho, foram analisadas as CNVs de 80 pacientes com diagnóstico prévio do TEA e que realizaram exame de *microarray*. A amostra foi composta de 62 indivíduos do sexo masculino e 18 indivíduos do sexo feminino, havendo uma maior predominância do sexo masculino, com uma proporção aproximada de 4:1. A média de idade dos pacientes foi de 6 anos, sendo a mediana e a moda equivalentes a 5 anos. Nesta amostra, foi encontrado somente 1 caso de pais consanguíneos e 4 casos de recorrência familiar, sendo 2 casos de gêmeos similarmente afetados e dois casos de primos afetados.

Dos 80 pacientes, 37 apresentaram o quadro de TEA isolado, e 43 pacientes apresentaram o TEA associado à dismorfias.

Dos 80 pacientes presentes nesta amostra, 60 (75%) apresentaram o resultado do exame de *microarray* normal, e 20 (25%) apresentaram o resultado do exame de *microarray* alterado, sendo que 7 deles (9%) apresentaram CNVs patogênicas, e 13 (16%) apresentaram CNVs de significado incerto (VOUS) (Tabela 1). Essas CNVs foram analisadas utilizando-se o banco de dados de rede proteica String e o banco de dados da Fundação Simons, especializada em pesquisas sobre o TEA.

Dos 7 pacientes com CNV patogênicas, 2 apresentavam TEA isolado e 5 apresentavam TEA com dismorfias. Já entre os 13 pacientes com CNV VOUS, 3 apresentavam TEA isolado e 10, TEA com dismorfias.

Dentre os 20 pacientes com exame de *microarray* alterado, 3 apresentavam também o exame de cariótipo alterado, exibindo um cromossomo marcador (47, XY + mar); os outros 17 pacientes apresentavam o exame de cariótipo normal.

Os genes encontrados nas CNVs e na rede proteica, associados ao TEA, bem como sua classificação no score do SFARI-gene estão nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 1** – Casos com CNVs patogênicas ou VOUS.

ID	Clínica	Sexo	CNV arr [GRCh37] *	Nº de cópias	Tamanho (Kb)	Classificação **	Nº de genes
1	TEA + Atraso neuropsicomotor + Baixa estatura e peso. Cariótipo: 47, XY, +mar	M	15q11.2q13.3(22770421_32915723) x4	4	10145	PATOGÊNICA	167
2	TEA + Macrocefalia. Cariótipo normal	F	15q11.2q13.1(22770421_28928730) x3	3	6158	PATOGÊNICA	129
3	TEA + DI + Dismorfias. Cariótipo normal	M	15q11.2q13.1(22770421_28704050) x3	3	5934	PATOGÊNICA	128
4	TEA + DI + Baixa estatura + Obesidade. Cariótipo normal	F	16p11.2(29580020_30190029) x1	1	610	PATOGÊNICA	31
5	TEA+ DI. Cariótipo: 47, XY, +mar	M	18p11.32p11.21(136227_15170636) x3	3	15034	PATOGÊNICA	109
6	TEA. Cariótipo normal	M	Xq28(154752352_154780670) x0	0	28	PATOGÊNICA	1
7	TEA. Cariótipo normal	M	Xq28(153157412_153868487) x2	2	711	PATOGÊNICA	39
8	TEA+ Perda do desenvolvimento motor e linguagem. Cariótipo normal	M	9p24.2(2688521_2787594) x1	1	99	VOUS	1
9	TEA. Cariótipo: 47, XY, +mar	M	10p15.3(246011_474284) x3	3	228	VOUS	3
			15q11.2(22770421_23625785) x3	3	885	VOUS	12
10	TEA + Atraso neuropsicomotor. Cariótipo normal	M	16p13.3(5474788_6340501) x3	3	866	VOUS	3
11	TEA + Hipotonia muscular. Cariótipo normal	F	15q15.3(43868570_43977181) x1	1	109	VOUS	4
12	TEA + Atraso do desenvolvimento + Macrocefalia. Cariótipo normal	M	Xq28(153357653_153358107) x0	0	0,454	VOUS	1
13	TEA + Atraso motor + malformações. Cariótipo normal	M	1q41(218593677_218899769) x1	1	306	VOUS	3
			5q33.1(150202191_150229902) x1	1	28	VOUS	1
14	TEA. Cariótipo normal	M	Xq28(153357355_153358107) x0	0	0.752	VOUS	1
15	TEA. Cariótipo normal	M	9p24.3(208454_289697) x1	1	81	VOUS	2
16	TEA + Atraso neuropsicomotor + Criptorquidia. Cariótipo normal	M	6q22.1(116273467_116631592) x3	3	358	VOUS	7
17	TEA + Macrocefalia. Cariótipo normal	M	14q31.1(79328701_79473602) x1	1	145	VOUS	1
18	TEA. Cariótipo normal	M	Xp22.33 ou Yp11.32(700141_1524208 ou 650141_1474208) x3	3	824	VOUS	10
19	TEA + Atraso neuropsicomotor + Encefalopatia secundária. Cariótipo normal	F	11q13.4(73228635_73639033) x3	3	410	VOUS	6
20	TEA + Alterações ósseas. Cariótipo normal	M	8q22.3(104249840_104529833) x3	3	280	VOUS	5

ID – paciente; DI - deficiência intelectual; \*De acordo com ISCN 2016; \*\*De acordo com ACMG 2016. Fonte: Resultados da pesquisa.

## 5. 1 ANÁLISE DAS CNVS PATOGÊNICAS

### 5.1.1 Paciente 1

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a atraso neuropsicomotor, baixa estatura e baixo peso. O exame de cariótipo apresentou 47, XY, +mar. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 15 (15q11.2q13.3), possuindo 4 cópias dessa região e tamanho de 10145 kb. O resultado do SNP-array permitiu caracterizar o cromossomo marcador como um isocromossomo 15q11.2q13.3. Nessa região, estão localizados 167 genes, incluindo genes que já foram descritos no OMIM como associados à síndrome de duplicação 15q11-q13 (OMIM:#608636), dando à CNV seu caráter patogênico. Analisando os genes presentes nessa região, no banco de dados da rede proteica STRING, foi observado que, até o momento, somente 43 proteínas dos 167 genes possuem estrutura conhecida. Foi observada interação entre a maioria das proteínas associadas a esses genes.

Durante a análise, para até 100 proteínas, foram observadas 4 proteínas (*CYFIP1*, *EIF4A3*, *NDN*, *WASF1*) associadas a processos no sistema nervoso, envolvidas no processo de formação das estruturas do neurônio. Quando analisados, no banco de dados SFARI-gene, os genes presentes na CNV e os genes encontrados na rede que apresentaram ligação com o sistema nervoso, foi possível observar 15 genes associados ao TEA sendo 2 genes (*UBE3A*, *MAGEL2*) pertencentes à categoria 1 (alta confiança), 7 genes pertencentes à categoria 2 (candidato forte) e 6 genes pertencentes à categoria 3 (evidência sugestiva) (Tabela 2).

### 5.1.2 Paciente 2

Paciente do sexo feminino, que apresentava quadro de TEA associado à macrocefalia e cariótipo normal. A CNV encontrada nessa paciente está localizada no cromossomo 15 (15q11.2q13.1) apresentando 3 cópias dessa região, indicando que houve uma duplicação dessa região e tamanho 6158 kb, associada à síndrome de duplicação 15q11.2q13.1 (OMIM:#608636). Nessa região, estão localizados 129 genes. Ao se analisarem, no banco de dados STRING, os genes presentes na CNV, foram observadas 22 proteínas com estrutura descrita. Durante a análise, para até 100



proteínas, foram observadas 12 proteínas relacionadas a 5 funções no sistema nervoso em processos envolvidos na transmissão sináptica, resposta celular ao estímulo do fator de crescimento nervoso, via de sinalização do GABA-A e extensão de neurônios.

Na análise, no banco de dados SFARI-gene, foram observados 9 genes associados ao TEA, sendo 2 genes (*UBE3A*, *MAGEL2*) pertencentes à categoria 1 (alta confiança), 4 genes pertencentes à categoria 2 (candidato forte) e 3 genes pertencentes a categoria 3 (evidência sugestiva) (Tabela 2).

### 5.1.3 Paciente 3

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a deficiência intelectual (DI) e dismorfias, com exame de cariótipo e X-frágil normais. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 15 (15q11.2q13.1), possuindo 3 cópias dessa região e tamanho de 5934 kb. Nessa região, estão localizados 128 genes. Ao serem analisados, no banco de dados STRING, os genes presentes na CNV, foram observadas 22 proteínas com estrutura descrita. Durante a análise, para até 100 proteínas, foram observadas 12 proteínas relacionadas a 5 funções no sistema nervoso em processos envolvidos em transmissão sináptica, resposta celular ao estímulo do fator de crescimento nervoso, via de sinalização do GABA-A e extensão de neurônios.

Quando analisados no banco de dados SFARI-gene, foram observados 9 genes associados ao TEA, sendo 2 (*UBE3A*, *MAGEL2*) pertencentes a categoria 1 (alta confiança), 4 pertencentes a categoria 2 (candidato forte) e 3 pertencentes a categoria 3 (evidência sugestiva) (Tabela 2).

### 5.1.4 Paciente 4

Paciente do sexo feminino, que apresentava quadro de TEA associado a DI, baixa estatura, obesidade e cariótipo normal. A CNV encontrada nessa paciente está presente no cromossomo 16 (16p11.2), apresentando somente uma cópia dessa região e tamanho de 610 kb associado à síndrome de deleção 16p11.2 (OMIM: #611913). Nessa região, estão localizados 31 genes. Ao serem analisados, no banco de dados STRING, os genes presentes na CNV, foram observadas 14 proteínas com estrutura descrita. Durante a

análise para até 100 proteínas, foram observadas 33 proteínas relacionadas a 25 funções no sistema nervoso, tais como processos envolvidos no desenvolvimento de neurônio e suas estruturas, desenvolvimento de estruturas cerebrais como o metencéfalo e transmissão sináptica.

Quando analisados no banco de dados SFARI-gene, foram observados 8 genes associados ao TEA, sendo 2 (*PTPN11* e *TSC2*) pertencentes à categoria 1 (alta confiança), 1 pertencente à categoria 2 (candidato forte), 5 pertencentes à categoria 3 (evidência sugestiva) e 1 pertencente à categoria 3S (sindrômico e de evidência sugestiva para o TEA idiopático) (Tabela 2).

### 5.1.5 Paciente 5

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a DI e exame de cariótipo exibindo o resultado 47, XY, +mar. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 18 (18p11.32p11.21), com 3 cópias dessa região e tamanho de 15034 kb. O resultado do SNP-array permitiu caracterizar o cromossomo marcador como 18p11.32p11.21. Nessa região, estão localizados 109 genes listados no OMIM, associados à trissomia do cromossomo 18p, também conhecida como síndrome de duplicação 18p, conferindo a essa CNV seu caráter patogênico. Analisando os genes presentes nessa região no banco de dados da rede protéica STRING, foram observadas, até o momento, 65 proteínas com estrutura conhecida para esses genes. Durante a análise para até 100 proteínas, não foram observadas proteínas associadas a processos desenvolvidos no sistema nervoso.

Ao analisar os genes presentes na CNV no SFARI-gene, foi possível observar 2 genes associados ao TEA, sendo 1 gene (*DLGAPI*) pertencente à categoria 2 (candidato forte) e 1 gene pertencente à categoria 3 (evidência sugestiva) de uma possível associação com o TEA (Tabela 2).

### 5.1.6 Paciente 6

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA, cariótipo não informado. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo X (Xq28), possuindo uma deleção dessa região e tamanho de 28kb. Nessa região, está

presente o gene *TMLHE* descrito no OMIM como de suscetibilidade ao TEA, ligado ao X, conferindo a essa CNV a patogenicidade. Ao analisar no banco de dados STRING o gene presente na CNV associado a 99 possíveis interações, não houve crescimento da rede e, conseqüentemente, não foram observadas proteínas associadas ao sistema nervoso. Quando o gene presente na CNV (*TMLHE*) foi analisado no banco de dados SFARI-gene, foi observado que ele se encontra classificado na categoria 2, sendo um candidato forte para associação ao TEA.

### 5.1.7 Paciente 7

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo X (Xq28), apresentando 2 cópias dessa região e indicando o ganho de uma cópia com tamanho de 711kb. Nessa região, estão localizados 39 genes. O ganho de cópias dessa região Xq28 está associado à síndrome de duplicação Xq28 (OMIM: 300815) e, quando a região inclui o gene *MECP2*, associa-se também à síndrome de duplicação *MECP2* (OMIM:300260), dando a essa CNV seu caráter patogênico.

Ao analisar, no banco de dados STRING, os genes presentes na CNV, foram observadas 30 proteínas com estrutura descrita. Durante a análise para até 100 proteínas, foram observadas 3 proteínas relacionadas à função no sistema nervoso de regulação negativa da axonogênese.

Quando analisados no banco de dados SFARI-gene, foram observados 3 genes associados ao TEA sendo 1 (*MECP2*) pertencente à categoria 1 (alta confiança) e 2 pertencentes à categoria 3 (evidência sugestiva) (Tabela 2).

## 5.2 ANÁLISE DAS CNVS VOUS E SUBCLASSIFICAÇÃO: PROVAVELMENTE BENIGNA, PROVAVELMENTE PATOGÊNICA OU SEM SUBCLASSIFICAÇÃO, A PARTIR DA ANÁLISE DA REDE DE GENES.

### 5.2.1 Paciente 8

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a perda do desenvolvimento motor, perda de linguagem e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 9 (9p24.2), apresentando apenas uma cópia dessa região e tamanho de 99 kb. Nessa região, está localizado somente o gene *KCNV2*.

Durante a análise do gene *KCNV2* no banco de dados da rede protéica STRING com até 100 proteínas, não houve ampliação da rede, ficando limitada a 5 proteínas. Também não foram observadas proteínas associadas ao sistema nervoso. Ao analisá-lo no banco de dados SFARI-gene, não foi encontrada associação com TEA.

Subclassificação da VOUS: provavelmente benigna.

### 5.2.2 Paciente 9

Paciente do sexo masculino, que apresentava TEA e cariótipo 47, XY, +mar. Esse paciente apresentou 2 CNVs envolvendo ganho de cópias nos cromossomos 10 e 15. Esse resultado sugere que o cromossomo marcador identificado pela análise do cariótipo pode ser resultado de um rearranjo que envolve esses dois cromossomos.

A CNV encontrada no cromossomo 10 (10p15.3) apresenta 3 cópias dessa região e tamanho de 228 kb, onde estão presentes 3 genes (*ZMYND11*, *DIP2C*, *MIR7641-2*). No banco de dados da rede proteica STRING, foram encontradas somente proteínas descritas para os genes *ZMYND11* e *DIP2C*.

Ao se ampliar a rede para até 100 proteínas, ela só se expandiu em até 20 proteínas, e não foram observadas proteínas associadas ao sistema nervoso. Ao analisar esses genes no banco de dados SFARI-gene, foi possível observar 2 genes pertencentes à categoria 2 (candidato forte) para associação ao TEA (Tabela 2).

A CNV encontrada no cromossomo 15 (15q11.2) apresenta 3 cópias dessa região e tamanho de 885kb, incluindo 12 genes. Quando analisados no banco de dados da rede protéica STRING, foram encontradas somente 6 proteínas descritas para os

genes presentes nessa região. Durante a análise até 100 proteínas, foram observadas 28 proteínas associadas a 23 funções do sistema nervoso e relacionadas à neurogênese, diferenciação de estruturas do sistema nervoso, bem como à sua formação.

Ao se analisarem os genes no banco de dados SFARI-gene, foi possível observar 7 genes associados ao TEA, sendo 1 pertencente à categoria 1 (alta confiança), 1 pertencente à categoria 2 (candidato forte), 4 pertencentes à categoria 3 (evidência sugestiva) e 1 gene categoria 3S (sindrômico e evidência sugestiva para TEA idiopático) (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS – CNV em 10p15.3: provavelmente patogênica.  
CNV em 15q11.2: provavelmente patogênica.

### 5.2.3 Paciente 10

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a atraso neuropsicomotor e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 16 (16p13.3), possuindo 3 cópias dessa região, tamanho aproximado de 866 kb, onde estão localizados 3 genes: *LINC01570*, *MIR8065* e *RBFOX1*. Quando esses genes foram analisados no banco de dados da rede protéica STRING, foi encontrada somente a proteína referente ao gene *RBFOX1*. Ao ampliar a rede para até 100 genes, não houve progressão da rede e não foram observadas proteínas associadas ao sistema nervoso.

Na análise no banco de dados SFARI-gene, foi observado que o gene *RBFOX1* foi classificado na categoria 2 (candidato forte) para associação com o TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: provavelmente patogênica.

### 5.2.4 Paciente 11

Paciente do sexo feminino, que apresentava quadro de TEA associado a hipotonia muscular e cariótipo normal. A CNV encontrada nessa paciente está localizada no cromossomo 15 (15q15.3), possuindo 1 cópia dessa região e tamanho de 109 kb, incluindo os genes *PIIP5K1*, *CKMT1B*, *STRC*, *CATSPER2*. Durante a análise desses genes no banco de dados da rede protéica STRING com até 100 proteínas, foi possível observar 13 genes associados 5 funções relacionadas ao sistema nervoso tais

como processos ligados a potencial de ação neuronal, impulso nervoso, sinapses e junção neuromuscular.

Na análise no banco de dados SFARI-gene foram observados 3 genes pertencentes a categoria 2 (candidato forte) e 2 genes pertencentes a categoria 3 (evidência sugestiva) de associação ao TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: provavelmente patogênica.

### 5.2.5 Pacientes 12 e 13

O paciente 12, do sexo masculino, apresentava quadro de TEA associado a atraso do desenvolvimento e macrocefalia, cariótipo normal e X-Frágil normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo X (Xq28), não possuindo cópia dessa região e indicando uma deleção e tamanho 0,454 kb. O paciente do caso 13, também do sexo masculino, apresentava quadro de TEA e cariótipo normal, com uma CNV também no cromossomo X (Xq28), com deleção, em região semelhante e tamanho 0,752 kb. Nessa região, está localizado o gene *MECP2*.

Ao analisar esse gene no banco de dados da rede proteica STRING, com até 100 proteínas, não houve um crescimento considerável da rede, limitando-se a somente 9 proteínas. No entanto, foram observadas 3 proteínas associadas ao sistema nervoso relacionadas às funções de resposta celular a dopamina e desenvolvimento do dendrito.

Na análise no banco de dados SFARI-gene, foram observados 2 genes associados ao TEA, sendo os 2 pertencentes à categoria 1 (alta confiança) para associação com o TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS para os pacientes 12 e 13: provavelmente patogênica

### 5.2.6 Paciente 14

Paciente do sexo masculino, que apresentava TEA associado a atraso motor, dismorfias e cariótipo normal. Esse paciente apresentou, no exame de *microarray*, 2 CNVs. A primeira CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 1 (1q41), possuindo uma cópia dessa região e tamanho de 306 kb, onde estão presentes os genes *TGFB2*, *MIR548F3*, *TGFB2-OT1*.

A análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas mostrou 22 proteínas relacionadas a 18 funções do sistema nervoso, tais como desenvolvimento do sistema nervoso, regulação da diferenciação de células gliais, regulação do processo apoptótico do neurônio e processos relacionados à formação de estruturas do sistema nervoso.

A análise no banco de dados SFARI-gene mostrou 2 genes associados ao TEA, sendo 1 pertencente à categoria 1 (alta confiança) e 1 à categoria 2 (candidato forte) para associação com o TEA (Tabela 2).

A segunda CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 5 (5q33.1) possuindo uma cópia dessa região e tamanho de 28 kb. Nessa CNV, está localizado o gene *IRGM*. Durante a análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, não houve expansão da rede e não houve outras possíveis interações.

A análise no banco de dados SFARI-gene não sugeriu nenhuma relação com o gene da CNV ao TEA.

Subclassificação da VOUS – CNV em 1q41: provavelmente patogênica. CNV em 5q33.1: provavelmente benigna.

### **5.2.7 Paciente 15**

Paciente do sexo masculino, que apresentava TEA e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 9 (9p24.3), possuindo 1 cópia dessa região e tamanho de 81 kb, onde estão localizados os genes *C9orf66* e *DOCK8*.

A análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas revelou que não houve expansão da rede, mostrando somente 9 proteínas associadas. Dentre essas proteínas, não foram observadas proteínas associadas ao sistema nervoso. Analisando a CNV no banco de dados SFARI-gene, foi observado 1 gene (*DOCK8*) pertencente à categoria 2 (candidato forte) para associação ao TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: provavelmente patogênica

### 5.2.8 Paciente 16

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a atraso neuropsicomotor e criptorquidia, cariótipo normal e pesquisa para X-Frágil normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 6 (6q22.1) possuindo 3 cópias dessa região e tamanho de 358kb, onde estão presentes os genes *FRK*, *TPIIP3*, *NT5DC1*, *COL10A1*, *TSPYL4*, *DSE*, *TSPYL1*.

Analisando esses genes no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, não houve expansão da rede, mostrando somente 6 proteínas, nenhuma delas associada ao sistema nervoso.

Analisando a CNV no banco de dados SFARI-gene, foi observado somente um gene de categoria 3 (evidência sugestiva) para associação com o TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: sem subclassificação

### 5.2.9 Paciente 17

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a macrocefalia, cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está localizada no cromossomo 14 (14q31.1), possuindo 1 cópia dessa região e tamanho de 145 kb, onde está presente o gene *NRXN3*.

Durante a análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, foi possível observar 37 proteínas relacionadas a 69 funções no sistema nervoso, atuando em processos envolvidos em sinapses, desenvolvimento do sistema nervoso, secreção de neurotransmissores, geração de neurônios, diferenciação de neurônios, além de processos associados ao desenvolvimento de estruturas do cérebro.

A análise no banco de dados SFARI-gene mostrou 20 genes associados ao TEA, sendo 9 pertencentes à categoria 1 (alta confiança), 5 pertencentes à categoria 2 (candidato forte) e 6 genes pertencentes à categoria 3 (evidência sugestiva) para associação com o TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: provavelmente patogênica.



### 5.2.10 Paciente 18

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente pode estar presente no cromossomo X (X p22.33) ou no Y (Yp11.32), por se tratar de uma região pseudoautosômica. Possui 3 cópias dessa região e tamanho de 824 kb, onde estão presentes os genes *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *ASMTL*.

Durante a análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, foi possível observar 20 proteínas relacionadas a 16 funções no sistema nervoso atuando em processos envolvidos em neurogênese, proliferação das células gliais, diferenciação de neurônios e desenvolvimento de sistema nervoso.

A análise no banco de dados SFARI-gene mostrou 2 genes associados ao TEA, ambos classificados na categoria 1 (Alta confiança) para associação ao TEA (Tabela 2).

Subclassificação da VOUS: provavelmente patogênica.

### 5.2.11 Paciente 19

Paciente do sexo feminino, que apresentava quadro de TEA associado a atraso neuropsicomotor, encefalopatia secundária e cariótipo normal. A CNV encontrada nessa paciente está presente no cromossomo 11 (11q13.4), possuindo 3 cópias dessa região, e tamanho de 410 kb, onde estão presentes os genes *FAM168A*, *PLEKHBI*, *RAB6A*, *MRPL48*, *COA4*, *PAAF1*.

Durante a análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, não houve expansão da rede nem interações proteicas.

A análise da CNV no banco de dados SFARI-gene não sugeriu associação para o TEA em nenhum dos genes presentes na CNV.

Subclassificação da VOUS: provavelmente benigna.

### 5.2.12 Paciente 20

Paciente do sexo masculino, que apresentava quadro de TEA associado a alterações ósseas e cariótipo normal. A CNV encontrada nesse paciente está presente no cromossomo 8 (8q22.3), possuindo 3 cópias dessa região e tamanho de 280 kb, onde estão presentes os genes *FZD6*, *CTHRC1*, *SLC25A32*, *DCAF13*, *RIMS2*.

Durante a análise no banco de dados da rede proteica STRING com até 100 proteínas, não houve expansão da rede nem interações proteicas.

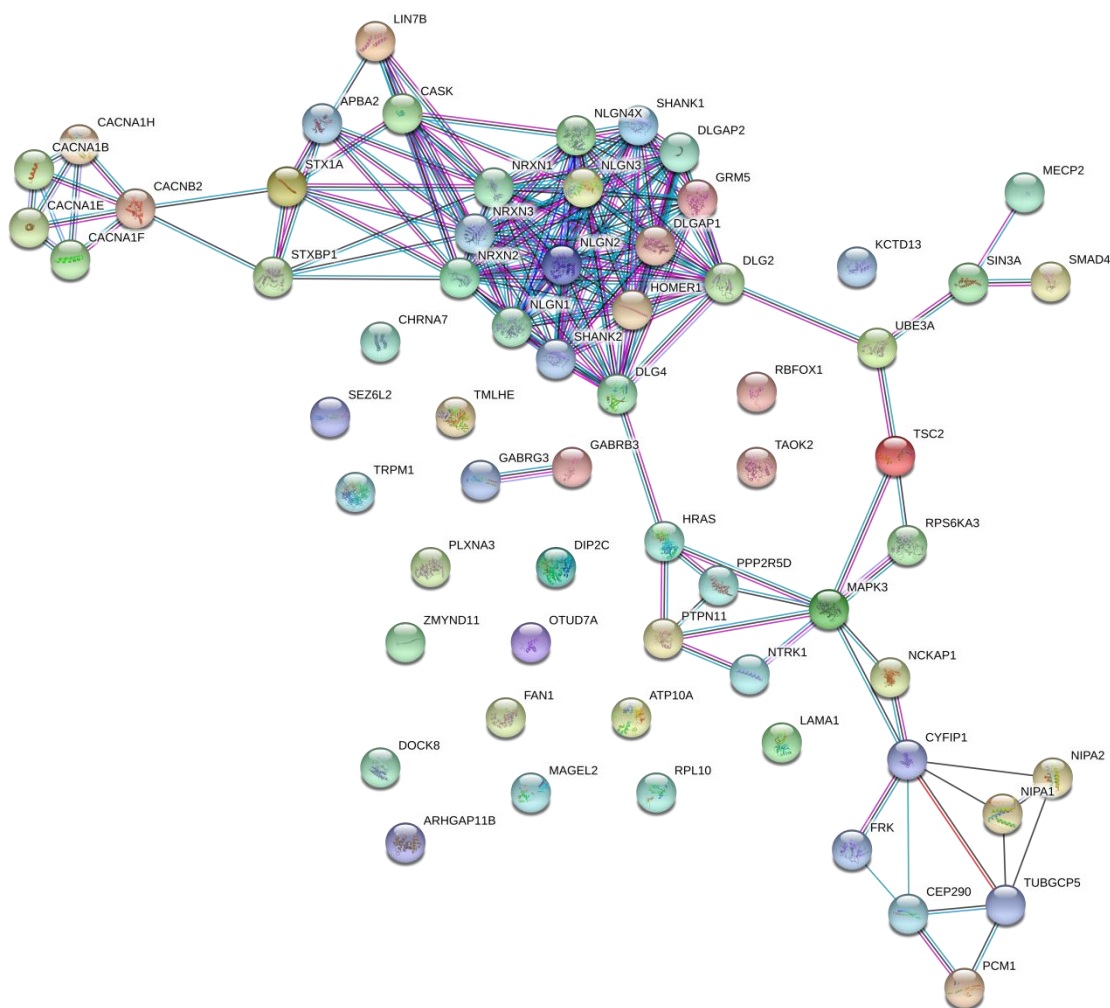
A análise da CNV no banco de dados SFARI-gene não sugeriu associação para o TEA em nenhum dos genes presentes na CNV.

Subclassificação da VOUS: provavelmente benigna.

### 5.3 REDE PROTEICA STRING – GENES TEA

Nessa rede, estão todos os genes associados ao TEA encontrados nesta amostra.

**Figura 1** – Rede proteica com os genes associados ao TEA encontrados na amostra.



Fonte: Banco de dados do site STRING.

**Tabela 2** – Genes associados ao TEA presentes nas CNVs e na Rede STRING e suas respectivas classificações, de acordo com cada paciente.

Genes associados ao TEA – SFARI-GENE			
Classificação da CNV	ID	Genes presentes na CNV	Genes encontrados no STRING
Patogênica	1	APBA2 (3), ARHGAP11B (3), ATP10A (2), CHRNA7(2), CYFIP1 (2), FAN1 (3), GABRB3 (2), GABRG3 (2), MAGEL2 (1), NIPA1 (3), NIPA2 (3), OTUD7A (2), TRPM1 (2), TUBGCP5 (3), UBE3A (1)	CYFIP1 (2)
	2	ATP10A (2), CYFIP1 (2), GABRB3 (2), GABRG3 (2), MAGEL2 (1), NIPA1 (3), NIPA2 (3), TUBGCP5 (3), UBE3A (1)	CYFIP1 (2), GABRB3 (2), GABRG3 (2)
	3	ATP10A (2), CYFIP1 (2), GABRB3 (2), GABRG3 (2), MAGEL2 (1), NIPA1 (3), NIPA2 (3), TUBGCP5 (3), UBE3A (1)	CYFIP1 (2), GABRB3 (2), GABRG3 (2)
	4	KCTD13 (3), MAPK3 (3), SEZ6L2 (3), TAOK2 (2)	MAPK3 (3), NTRK1 (3), RPS6KA3 (3S), PTPN11 (1), TSC2 (1)
	5	LAMA1 (3), DLGAP1 (2)	0
	6	TMLHE (2)	0
	7	MECP2 (1), PLXNA3 (3), RPL10 (3)	PLXNA3 (3)
VOUS	8	0	0
	9	<b>CNV 10p:</b> DIP2C (2), ZMYND11 (2) <b>CNV 15q:</b> CYFIP1 (2), NIPA1 (3), NIPA2 (3), TUBGCP5 (3)	<b>CNV10p:</b> 0 <b>CNV 15q:</b> CEP290 (3S), CYFIP1 (2), NCKAP1 (1), PCM1 (3)
	10	RBFOX1 (2)	0
	11	0	CACNA1B (3), CACNB2 (2), CACNA1F (3), CACNA1E (2), CACNA1H (2)
	12	MECP2 (1)	MECP2 (1), SIN3A (1)
	13	MECP2 (1)	MECP2 (1), SIN3A (1)
	14	<b>CNV 1q:</b> 0 <b>CNV 5q:</b> 0	<b>CNV 1q:</b> PPP2R5D (1), SMAD4 (2) <b>CNV 5q:</b> 0
	15	DOCK8 (2)	0
	16	FRK (3)	0
	17	NRXN3 (1)	APBA2 (3), CASK (1), DLG2 (2), DLG4 (1), DLGAP1 (2), DLGAP2 (3), GRM5 (3), HOMER1 (3), LIN7B (3), NLGN1 (2), NLGN2 (1), NLGN3 (1), NLGN4X (2), NRXN1 (1), NRXN2 (1), NRXN3 (1), SHANK1 (2), SHANK2 (1), STX1A (3), STXBP1 (1)
	18	0	HRAS (1), PTPN11 (1)
	19	0	0
	20	0	0

Legenda: ID – paciente; Categoria 1 - alta confiança, (1); Categoria 2 – candidato forte, (2); Categoria 3 – evidência sugestiva, (3); Categoria 3S – Associado ao TEA síndrônico e de evidência sugestiva para o TEA idiopático, (3S).

Fonte: Resultados da pesquisa.

**Tabela 3** – Genes encontrados nas análises e sua classificação de acordo com SFARI-gene

<b>Genes de acordo com a categoria classificatória do SFARI-gene</b>		
<b>Categoria</b>	<b>Genes</b>	<b>Total</b>
<b>1</b>	CASK, DLG4, HRAS, MAGEL2, MECP2, NCKAP1, NLGN2, NLGN3, NRXN1, NRXN2, NRXN3, PPP2R5D, PTPN11, SHANK2, SIN3A, STXBP1, TSC2, UBE3A	18
<b>2</b>	ATP10A, CACNA1E, CACNA1H, CACNB2, CHRNA7, CYFIP1, DIP2C, DLG2, DLGAP1, DOCK8, GABRB3, GABRG3, NLGN1, NLGN4X, OTUD7A, RBFOX1, SHANK1, SMAD4, TAOK2, TMLHE, TRPM1, ZMYND11	22
<b>3</b>	APBA2, ARHGAP11B, CACNA1B, CACNA1F, DLGAP2, FAN1, FRK, GRM5, HOMER1, KCTD13, LAMA1, LIN7B, MAPK3, NIPA1, NIPA2, NTRK1, PCM1, PLXNA3, RPL10, SEZ6L2, STX1A, TUBGCP5	22
<b>1S</b>	0	0
<b>2S</b>	0	0
<b>3S</b>	CEP290, RPS6KA3	2
<b>Total de genes</b>		<b>64</b>

Fonte: Resultados da pesquisa.

## 6. DISCUSSÃO

Quanto ao sexo, a amostra analisada apresentou uma proporção aproximada de 4:1, havendo nela maior quantidade de indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, o que corresponde ao descrito na literatura científica, sugerindo um modelo de proteção feminino para o TEA.<sup>62</sup> A análise das CNVs que foram classificadas, de acordo com o ACMG, como patogênicas mostrou elementos que confirmam a patogenicidade delas, como foi observado nos 3 casos de CNVs patogênicas no cromossomo 15q, compatíveis com a síndrome de duplicação 15q11-q13 (OMIM: 608636). A região 15q11.2-13.3 é muito propensa a rearranjos cromossômicos, devido à existência de pontos de interrupção cromossômica. As duplicações presentes nessa região são essencialmente maiores que as deleções, como foi observado em pacientes deste trabalho que apresentavam tamanho de 10.145kb, 6.158kb e 5.934kb.<sup>44, 67, 68</sup>

A CNV presente na região 15q11.2 foi citada em 83 relatórios de TEA, nos quais estão presentes os genes *TUBGCP5*, *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*, *MAGEL2*, e *UBE3A* contidos nessa região, sugerindo que esses genes possam estar agindo no desenvolvimento do TEA, como foi observado na rede proteica com os genes associados ao TEA (Figura 1).<sup>7</sup> Na figura, é possível observar o nível de interações entre esses genes através do *cluster* que agrupa esses genes. Estudos que avaliam deleções e duplicações nessa região, que podem ser de origem materna ou paterna, têm mostrado uma série de características – atraso do desenvolvimento motor, problemas comportamentais, epilepsia, DI e problemas na fala – indicadoras de que tanto a falta como o excesso do produto gênico desses genes exercem um papel significativo no desenvolvimento do indivíduo. Observa-se a possibilidade de que as duplicações mais associadas ao TEA sejam, em sua maioria, herdadas do lado materno.<sup>69- 72</sup>

A CNV patogênica presente no cromossomo 16, na região 16p11.2, é conhecida como a síndrome de deleção 16p11.2 (OMIM: #611913 ) e apresenta uma grande variação fenotípica, sendo as características mais comumente identificadas a DI, o atraso de linguagem, o atraso de desenvolvimento, bem como problemas comportamentais como ansiedade, epilepsia, entre outras dismorfias, ocorrendo relatos também de sua possível associação com o TEA.<sup>73, 74</sup>

A CNV patogênica presente no cromossomo 18, na região 18p11.32p11.21, é considerada uma alteração muito rara (1/1.000.000), conhecida como síndrome da duplicação 18p, ou trissomia 18p, sendo seu fenótipo pouco esclarecido em virtude da variabilidade de características apresentadas. Dentre os fenótipos exibidos estão atraso do desenvolvimento, dismorfias faciais, epilepsia e DI, podendo também estar associados à infertilidade masculina. A ocorrência dessa duplicação no cromossomo 18p pode ser de origem *de novo* ou herdada de um dos pais com a mesma duplicação.<sup>75-77</sup>

As 2 CNVs patogênicas no cromossomo X encontradas neste trabalho apresentam características peculiares que afirmam sua essência patogênica, embora de formas distintas. A primeira CNV, no cromossomo X, é representada por uma deleção no braço longo do cromossomo, região Xq28, na qual se inclui a perda dos exons 2 e 3 do gene *TMLHE* (OMIM: 300777), que tem sido descrito como um possível gene de susceptibilidade ao TEA ligado ao X (OMIM: 300872). Um estudo desenvolvido em 2011 descreveu um paciente com deleção do exon 2 do gene *TMLHE*, que codifica a primeira enzima da biossíntese da carnitina, levando ao aumento da concentração do substrato (6-N-trimetil-lisina) e diminuição dos níveis dos produtos no plasma e na urina. Estudos seguintes demonstraram a função desse gene e propuseram que a desregulação do metabolismo da carnitina pode exercer papel importante no autismo não síndrômico. A análise de famílias multiplex com probandos e irmãos do sexo masculino apresentando TEA evidenciou o risco para o desenvolvimento do TEA na deficiência do produto do gene *TMLHE*.<sup>78-80</sup>

A outra CNV no cromossomo X é conhecida como síndrome de microduplicação distal Xq28 (OMIM: 300815), cujo fenótipo apresenta DI síndrômica rara e hereditária. Entretanto, no que tange ao TEA, a presença do gene *MECP2* nessa região destaca a síndrome de duplicação do *MECP2* (OMIM:300260), caracterizada por um distúrbio do desenvolvimento neurológico ligado ao X, no qual apresenta DI grave, atraso do desenvolvimento da fala, convulsões, espasticidade progressiva, hipotonia infantil, dismorfias e TEA. Somente os homens são afetados, embora as mulheres portadoras possam apresentar características neuropsiquiátricas, como ansiedade. Essas duplicações no *MECP2* são consideradas como eventos não recorrentes, uma vez que os

locais dos pontos de interrupção e os tamanhos dos rearranjos variam entre os indivíduos afetados. O *MECP2* tem papel fundamental no desenvolvimento da síndrome de RETT, que atualmente faz parte do amplo espectro do TEA.<sup>81-83</sup>

Neste estudo, foram encontradas CNVs patogênicas em 3 dos cromossomos mais associados ao TEA: os cromossomos 15, 16 e X.<sup>64</sup> A região 15q11.2 e a 16p11.2 dos cromossomos 15 e 16, respectivamente, têm mostrado grande associação em pacientes que apresentam TEA. Por exemplo, há muitos estudos sobre o cromossomo 16, segundo os quais a presença de duplicações segmentares (LCRs) favorece a recombinação homóloga não alélica que predispõe essa região a rearranjos cromossômicos<sup>42,45,50, 64</sup>. Apesar de ser descrito como uma das regiões mais frequentemente associada ao TEA, justamente pela presença do gene *SHANK3*, não foram encontradas CNVs patogênicas e nem CNVs VOUS no cromossomo 22 nesta pesquisa.

Neste trabalho, foram encontradas CNVs VOUS em 11 cromossomos (1, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 e X), evidenciando sua característica de estar presente em todos os cromossomos humanos.<sup>11</sup> Entretanto, por não exibir uma caracterização definida, permanece ainda sem significação quanto ao papel que exerce na expressão dos fenótipos alterados exibidos por quem os tem. A análise dos genes encontrados nessas CNVs, na rede proteica STRING, revelaram, através das possíveis interações protéicas e gênicas, até que ponto essas CNVs VOUS estão atuando ou não naqueles fenótipos.

Os genes presentes nessas CNVs VOUS se mostraram em interação com outros genes dos demais cromossomos, dos quais muitos genes são descritos como associados ao TEA. Três pacientes (10, 15, 16) (Tabela 2) não apresentaram genes associados ao TEA durante a análise na rede protéica STRING; entretanto, os genes presentes na CNV exibiam relatório de associação ao TEA no SFARI-gene. O gene *RBFOX1* (paciente 10) (Tabela 2) é um candidato forte para associação como o TEA, uma vez que sua função alterada afeta a migração neuronal e a formação das redes de sinapse durante a corticogênese, levando ao desenvolvimento anormal do cérebro e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do TEA<sup>84, 85</sup>. Outro gene observado na CNV associado ao TEA e considerado como um candidato forte para essa associação é o *DOCK8*, presente na CNV do paciente 15 (Tabela 2). Esse gene é expresso nos cérebros de adultos e em

fetos, e foi observado que duplicações nesse gene estão fortemente associadas a vários distúrbios neuropsiquiátricos. Tal característica sugere que a regulação da expressão desse gene deve ser necessária para que haja uma função cerebral normal.<sup>86</sup> Com base nesses genes presentes na CNV, é possível reclassificar a CNV VOUS para a sua patogenicidade quando associada ao TEA, uma vez que ela apresenta genes relacionados fortemente a funções cerebrais e é descrito em pacientes que apresentam o fenótipo para TEA, como nos casos dos pacientes 10 e 15. O paciente 16 apresentou um único gene (*FRK*) como evidência sugestiva para associação com TEA, não oferecendo relatórios robustos relacionados ao TEA. Sendo assim, essa CNV VOUS permanece com sua classificação VOUS, ou seja, sem subclassificação.

Dos três pacientes que exibiram genes associados ao TEA somente na rede protéica STRING (casos 11, 14, 18), os genes encontrados no paciente 11 (*CACNB2*, *CACNAIE*, *CACNAIH*) (Tabela 2) são considerados candidatos fortes para associação como o TEA, uma vez que tais genes codificam proteínas associadas ao complexo do canal de sódio dependente de voltagem e, dessa forma, atuam mediando a concentração de íons cálcio na célula após a polarização da membrana, inclusive na membrana do neurônio. Na Figura 1, foi possível observar um *cluster* com esses genes e outros genes da mesma família do complexo do canal de cálcio e que possuíam classificação inferior para associação com o TEA (*CACNAIB* e *CACNAIF* – Categoria 3). Foram observadas mutações missense no gene *CACNAIH*, *CACNB2* e *CACNAIE*, sugerindo que a disfunção dos canais de cálcio pode, de alguma forma, estar contribuindo para a expressão do TEA<sup>87-90</sup>. O paciente 14 (Tabela 2) apresentou o gene *PPP2R5D*, indicado como de alta confiança para associação com TEA, uma vez que esse gene já é conhecido por estar associado a distúrbios do desenvolvimento neurológico e DI; também foi observada, em outros trabalhos, sua associação com outros genes previamente conhecidos por atuarem na expressão do TEA<sup>91,92</sup>. Outro gene apresentado por esse paciente foi o *SMAD4*, considerado um candidato forte para associação com o TEA por apresentar, através do sequenciamento do genoma completo, mutações missense que estão envolvidas em distúrbios do neurodesenvolvimento e associadas ao TEA<sup>93, 94</sup>. O paciente 18 (Tabela 2) apresentou 2 genes de alta confiança para a associação como o TEA. Quando deletado o gene *HRAS*, foram observadas



características autistas dentro do espectro de RASopatias, que são condições clinicamente raras que afetam o desenvolvimento e o crescimento. Dentre as RASopatias conhecidas, temos a neurofibromatose tipo 1, a síndrome de Noonan, a síndrome de Costello e a síndrome cutânea cardio-facial<sup>95, 96</sup>. E o gene *PTPN11* também é considerado de alta confiança para associação ao TEA, uma vez que ele pode estar associado ao desenvolvimento do cérebro humano elucidando as bases dos mecanismos neurais associados à memória e à atenção.<sup>97, 98</sup>

Diante do que foi observado nesses 3 pacientes (11, 14 e 18), foi possível reclassificar as CNVs VOUS como provavelmente patogênicas, em virtude da presença de genes descritos associados ao TEA. Vale salientar que o paciente 14 possuía 2 CNVs em cromossomos diferentes (1q e 5q); a CNV presente no cromossomo 5 foi reclassificada como provavelmente benigna para o TEA, por não apresentar nenhum gene associado ao sistema nervoso ou ao TEA. Dessa forma, a CNV desse paciente encontrada no cromossomo 1, que foi reclassificada como provavelmente patogênica para o TEA, seria responsável e suficiente, até o presente momento, para exibir o fenótipo de TEA apresentado pelo paciente.

Os pacientes 9, 12, 13 e 17 (Tabela 2) apresentaram genes associados ao TEA tanto na CNV quanto nos genes encontrados na rede de genes. Uma das CNVs presentes no paciente 9, no cromossomo 10, apresentou 2 genes que são candidatos fortes para associação com o TEA. O gene *DIP2C* tem sido relatado como associado ao TEA em estudos de sequenciamento em que foram observadas mutações na estrutura do gene.<sup>99</sup> O segundo gene encontrado nessa CNV é o gene *ZMYND11*, que vem sendo associado a deficiência intelectual e distúrbios comportamentais e da fala.<sup>100,101</sup> A segunda CNV apresentada pelo paciente 9 está presente no cromossomo 15, que, além de apresentar os mesmos genes descritos nas CNVs do 15, descritas nos casos 1, 2 e 3 discutidos anteriormente, apresentou o gene *NCKAP1*, classificado como de alta confiança para associação ao TEA. O gene *NCKAP1* apresentou mutações missense de *novo* em pacientes com TEA.<sup>102</sup> Por se tratar de uma paciente que apresentou um cromossomo marcador, acredita-se que possa ter havido um rearranjo entre os cromossomos 10 e 15. A análise pela hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), utilizando-se sondas para esses cromossomos, seria importante para confirmar essa hipótese, bem como a análise

pela FISH nos pais também é importante, para identificar possível translocação equilibrada em um deles e estimar risco de recorrência para progênie.

Os pacientes 12 e 13, além de exibirem o gene *MECP2*, também apresentaram o gene *SIN3A*, ambos de alta confiança para o TEA. O gene *SIN3A* mostrou-se interagindo com o *MECP2* associado à DI (Figura 1). Foi observado também, em estudos com ratos, que alterações dos níveis do produto gênico desse gene induziram uma neurogênese cortical reduzida e aberrações no desenvolvimento cerebral do rato. Foram observadas que variantes com perda de função nesse gene estariam associadas à DI.<sup>103, 104</sup>

O paciente 17 apresentou, em sua CNV, o gene *NRXN3*, considerado de alta confiança para associação com o TEA. Esse gene produz moléculas de adesão pré-sináptica que afetam as sinapses e a condução dos sinais nervosos. Ele tem sido amplamente citado com um papel importante no desenvolvimento do TEA. Através da técnica de *microarray*, foi observada, em uma família de 3 gerações, uma deleção do exônica rara. Em estudos, foram observadas deleções em todo o gene ou somente em uma parte do gene; 39% dos indivíduos que apresentavam deleções possuíam características autistas.<sup>105, 106</sup>

Esse paciente (17) apresentou, em sua rede protéica, o maior número de genes associados ao TEA, 20 no total, e, desses, 9 foram classificados como de categoria 1 (alta confiança para o TEA). Dentre esses genes encontrados na rede protéica, foram observados os genes *NRXN1*, *NRXN2*, *NRXN3*, que já são conhecidos por sua associação ao TEA<sup>105, 106</sup> O gene *CASK*, também encontrado na rede, é considerado um gene de alta confiança para associação ao TEA, devido à sua associação com distúrbios neurológicos. Um estudo que utilizou o sequenciamento de painel genético para TEA e DI, identificou 73 indivíduos com traços autistas e apresentando variantes no *CASK*.<sup>107,108</sup> Outro gene classificado como de alta confiança é o *DLG4*, associado a funções do neurodesenvolvimento. Em um estudo com genes ortólogos de *C. elegans*, foram observadas mutações missense altamente conservadas e associadas ao TEA em humanos.<sup>109</sup>

Outros genes apresentados por esse paciente (17) na rede são o *NLGN2* e *NLGN3*, ambos classificados como de alta confiança para associação com o TEA. O

gene *NLGN2* é responsável pela sinalização inibitória do GABA-A. Foram observadas CNVs em 17p13.1 englobando o *NLGN2* e a presença de uma variante sem sentido associada ao TEA. Em outro estudo, foi observada uma mutação missense nesse gene, na qual também foi observada uma deleção em *NRXN3*. Vale ressaltar que esses genes interagem juntos, sustentando a hipótese de que a interação neuroligina-neurexina pode estar envolvida diretamente no desenvolvimento do TEA.<sup>110, 111</sup> Na figura 1, é possível observar, no *cluster* central, a interação entre essas duas famílias de genes (*NLGN* e *NRXN*) com um número grande de interações entre eles e os demais genes associados ao TEA.

Quanto ao gene *NLGN3*, tem sido descrita uma variante comum associada ao desenvolvimento do TEA em homens<sup>112</sup>. Foi observada, também, a presença de uma mesma mutação de ponto em dois irmãos que apresentavam espectros diferentes do TEA, sugerindo que outros fatores genéticos podem interferir na penetrância da mutação<sup>113</sup>. A presença de variantes missense nesse gene confirma o envolvimento dele no desenvolvimento do TEA<sup>114</sup>.

O gene *SHANK2*, presente na rede desse paciente (17) é considerado de alta confiança para associação ao TEA. Ele foi descrito, em um grupo de crianças chinesas, como um gene de suscetibilidade para o TEA<sup>115</sup>, bem como através da edição de genes em células tronco, na qual foi observada alteração da morfogênese desses neurônios e perturbação das sinapses.<sup>116</sup> O gene *STXBPI*, encontrado na rede proteica, mostrou-se com um gene de alta confiança para o TEA. Foi observada, em um estudo, a presença de mutações *de novo* e perturbações genéticas neste gene associados ao TEA.<sup>117</sup> Outro achado sobre esse gene foi a presença de uma mutação *frameshift* causando a síndrome de Rett em uma menina, no Japão.<sup>118</sup>

Os pacientes 8, 19 e 20 não apresentaram genes associados ao sistema nervoso. Tampouco apresentaram genes associados ao TEA. Diante desse achado, essas CNVs foram consideradas como provavelmente benignas, não sendo responsáveis, até o presente momento, pelo desenvolvimento do TEA nesses pacientes. Para esses pacientes, seria importante o uso de outras técnicas para exame de diagnóstico, como exoma ou WGS, buscando identificar outras alterações que podem estar causando o TEA e que não foram sensíveis à técnica do *microarray*.

Neste trabalho, foi observada uma taxa de diagnóstico referente a 25% dos casos, sendo um pouco maior que a taxa de diagnóstico estabelecida na literatura pelo consórcio ISCA (International Standard Cytogenomic Array), de 15 a 20%.<sup>119</sup> Da amostra, 75% foram considerados com o resultado do exame de *microarray* normal para esta técnica. Foi encontrada uma frequência maior de CNVs VOUS (16%), quando comparada à das CNVs patogênicas (9%), evidenciando a dificuldade para se estabelecerem as causas para o TEA idiopático, dada a sua grande complexidade. A taxa de diagnóstico para as CNVs patogênicas (9%) encontrada neste trabalho, com os critérios estabelecidos pelo ACMG, se situou abaixo da taxa de diagnóstico das CNVs patogênica estabelecida na literatura, que atinge, em média, 12,2% de diagnóstico.<sup>119</sup>

No entanto, neste trabalho, o estudo das CNVs VOUS (de acordo com o ACMG) com base na análise de genes associados ao TEA, na rede STRING e SFARI-gene, permitiu a reclassificação de 09 das 13 CNVs VOUS para provavelmente patogênica. A análise através dessas ferramentas e, conseqüentemente, a reclassificação dessas CNVs, eleva a quantidade de CNVs consideradas patogênicas para 16 (anteriormente eram 7 CNVs), elevando também a taxa de diagnóstico de CNVs patogênicas para 20%.

No presente trabalho, foram encontrados 64 genes associados ao TEA, sendo os mais relevantes os que foram considerados pelo critério do Banco de Dados SFARI-gene como de alta confiança (18 genes) e como candidato forte (22 genes) para associação ao TEA. Uma análise criteriosa visando a confirmar essa associação pode contribuir para o aumento de genes nos painéis de diagnóstico clínico.

Os painéis de genes têm sido bastante utilizados para o diagnóstico claro de alterações em genes já conhecidos na literatura e associados a determinada doença. Existem vários painéis aplicáveis ao diagnóstico do TEA sendo comercializados. Por exemplo, a Companhia Centogene – The Rare Disease Company<sup>120</sup> – possui um painel com 45 genes para o autismo sintomático. Quando comparado aos genes encontrados neste trabalho, que são categorizados como de alta confiança para associação, somente 2 genes (*NRXN1* e *PTPN11*) estão presentes no painel da Centogene.

Os demais 16 genes que não estão inclusos nesse painel constituem um grupo que possui genes amplamente associados ao TEA, tais como o *MECP2*<sup>81-83, 103, 104</sup>, *SHANK2*<sup>115, 116</sup> e a família de genes *NLGN2*, *NLGN3*, *NRXN1*, *NRXN2*, *NRXN3*<sup>105,106</sup>,

<sup>110-114</sup>, que tem sido objeto de estudos quanto à sua ação em conjunto no desenvolvimento do TEA.

Quanto aos sinais clínicos apresentados pelos pacientes nesta amostra, 54% apresentavam TEA associado à dismorfias, e 46% apresentaram o TEA isolado, sem outras manifestações clínicas, não havendo uma diferença significativa entre essas categorias. Essa variação de sinais clínicos evidencia a característica principal do TEA observado pelo espectro de fenótipos.

O entendimento das CNVs patogênicas tem se tornado cada vez mais claro. Entretanto, o desafio maior tem sido interpretar as CNVs VOUS (significado incerto) das quais não se tem certeza sobre sua patogenicidade. Neste trabalho, a análise das CNVs visando a identificar genes associados ao TEA, tanto aqueles presentes nas CNVs quanto os identificados a partir das interações proteicas com base no banco de dados STRING, permitiu uma reclassificação das CNVs para provavelmente patogênica ou provavelmente benigna. Embora a classificação das CNVs, até o momento, seja feita com base nos critérios do ACMG, estudos como este podem colaborar para esclarecimento das VOUS. A classificação de uma CNV unicamente como VOUS permanece uma incógnita para médicos, pacientes e familiares, deixando-os no conflito sobre a origem do TEA e mantendo-os na busca por respostas que esclareçam o distúrbio.

## 7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A falta de informações no questionário, bem como o preenchimento incorreto não permitiu a coleta de dados demográficos e sociais de forma clara e robusta. Isso inviabilizou a análise social, bem como a possibilidade de traçar um perfil clínico mais próximo do fenótipo exibido.

Nos casos em que foram encontradas CNVs muito pequenas, a falta de financiamento do projeto inviabilizou a confirmação dessas variantes através de outras técnicas, como o MLPA.

Outro ponto relacionado à falta de financiamento do projeto foi justamente a impossibilidade da realização do exame de *microarray* nos pais dos pacientes afetados buscando verificar a origem da CNV, se herdada ou *de novo*.

## 8. CONCLUSÕES

- A análise de CNVs patogênicas e VOUS permitiu a identificação dos principais genes associados ao TEA, sugerindo os principais mecanismos de ação para o desenvolvimento desse transtorno.
- O conhecimento dos genes associados ao TEA pode colaborar para a inserção desses novos genes em painéis, buscando oferecer um diagnóstico mais acurado para o paciente.
- A análise através da rede de genes permitiu conhecer e compreender as prováveis interações futuras dos genes e estabelecer os mecanismos de ação para a expressão do fenótipo.
- A análise da interação gênica na rede de genes, neste trabalho, foi crucial para o entendimento das CNVs VOUS, até o momento com significado incerto, embora o paciente apresente algum tipo de alteração.
- Diante da análise através da rede proteica, foi possível reclassificar as CNVs VOUS para o TEA de acordo com os genes encontrados, associados ao transtorno.
- Quanto às CNVs VOUS que foram reclassificadas como provavelmente benignas, é sugerido que sejam reavaliadas quanto à sua classificação, podendo haver mudança dessas CNV VOUS para benignas.
- O gene *NRXN3*, presente em uma CNV VOUS, foi o que apresentou o maior número de interações com genes de alta confiança para associação com o TEA, sugerindo estudos que busquem analisar as interações gênicas desse gene com os demais.
- Para o caso que permaneceu sem subclassificação, os casos em que não foi encontrada associação como o TEA e os casos que foram considerados normais, é sugerida a utilização de outras técnicas para o diagnóstico etiológico do TEA.
- Faz-se necessária a atualização dos painéis de genes, bem como a criação de painéis não associados ao TEA sindrômico, para que, dessa forma, possam abranger os pacientes que não possuem associação do TEA a alguma síndrome.

## REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde (OMS). Doenças do espectro do autismo. 2017.
2. Silva LR, Rodrigues FV, Camparoto ML, Kerche-Silva LE. A genética e a neurofisiologia do autismo. 2016. Doi: 10.13140/RG.2.1.2670.3126.
3. Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercandante M. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in brazil: a pilot study. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2011;41(2):1738-42.
4. Ferreira ECV. Prevalência de autismo em Santa Catarina: uma visão epidemiológica contribuindo para a inclusão social. [dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
5. Costa MIF, Nunesmaia HGS. Epidemiologia genética do autismo infantil no Nordeste do Brasil. *Psiquiatria Biológica* 1996;4(4):199-204.
6. Teixeira MCTV, Mecca TP, Velloso RL, Bravo RB, Ribeiro SHB, Mercadante MT, et al. Literatura científica brasileira sobre transtornos do espectro autista. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2010;56(5):607-14.
7. Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI Gene Autdb). 2019. [acesso em 21 July 2019]. Disponível em: <https://sfari.org/>.
8. Gupta AR, State MW. Autismo: genética. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2006;28:29-38.
9. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, [Biesecker LG](#), [Brothman AR](#), [Carter NP](#), et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics* 2010 May 14;86(5):749-64. Doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
10. Trakadis Y, Shevell M. Microarray as a first genetic test in global developmental delay: a cost-effectiveness analysis. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2011;53(11):994-99.
11. Ajuriahuerra J. Las psicosis infantiles. *Manual de psiquiatria infantil*. 4. ed. Barcelona: Toray-Masson; 1977. p. 673-731.
12. Assumpção FB, Pimentel AC. Autismo infantil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2000; 22(supl. I):37-9.
13. Klin A. Autismo e síndrome de asperger: uma visão geral. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2006;28(supll. I):S3-S11.



14. Ornitz EM; Ritvo ER. A síndrome do autismo: uma revisão crítica. *The American Journal of Psychiatry* 1976;133(6):609-21.
15. Rutter M. Diagnosis and definitions of childhood autism. *J Autism Dev Disord*. 1978;8(2):139-61.
16. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-I - Texto Revisado. Associação Americana de Psiquiatria, 1952
17. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-II - Texto revisado. 2. ed. Associação Americana de Psiquiatria, 1968.
18. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-III - Texto revisado. 3. ed. Associação Americana de Psiquiatria, 1980.
19. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-IV - Texto revisado. 4. ed. Associação Americana de Psiquiatria, 1994.
20. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. DSM-V - Texto revisado. 5. ed. Associação Americana de Psiquiatria, 2013.
21. Lançamento da CID. 11. ed. [acesso em 21 July 2019]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/detail/18-06-2018-who-releases-new-international-classification-of-diseases-\(icd-11\)](https://www.who.int/news-room/detail/18-06-2018-who-releases-new-international-classification-of-diseases-(icd-11)).
22. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados com a Saúde. (CID-10) 10. ed. 1993.
23. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados com a Saúde. (CID-11) 11. ed. [acesso em July 2019]. Disponível em: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f437815624>.
24. Carvalheira G, Vergani N, Brunoni D. Genética do Autismo. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2004;(26)4:270-2.
25. Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet* 2009; 46(1):1-8.
26. [Bailey A](#), [Le Couteur A](#), [Gottesman I](#), [Bolton P](#), [Simonoff E](#), [Yuzda E](#), et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. [Psychol Med](#) 1995;25(1):63-77.
27. Posar A, Visconti P. Autism in 2016: the need for answers. *J Pediatr (Rio J)* 2017 Mar - Apr;93(2):111-9. Doi: 10.1016/j.jpmed.2016.09.002.

28. Ng M, De Montigny JG, Ofner M, Do MT. Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003–2013. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada*. 2017;37(1):1-23.
29. Quais são as teorias e as pesquisas sobre as possíveis causas do autismo. 2018. [acesso em 01 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/geral-43577510>.
30. Sandin S, Schendel D, Magnusson P, Hultman C, Surén P, Sussner E, et al. Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Molecular Psychiatry* 2016;21:693-700.
31. Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, [Menold MM](#), [Donnelly SL](#), [Ravan SA](#), et al. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorders. *American Journal Medical Genetics*. 2002. v. 114, p. 99-105.
32. Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *Jornal de Pediatria* 2004;80(2).
33. Lai CSL, Fisher SE, Hurst J A, [Vargha-Khadem F](#), [Mônaco AP](#). A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 2001;413:519-23.
34. Costa MF, Nunesmaia HGS. Diagnóstico genético e clínico do autismo infantil. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 1998;56(1):24-31.
35. Geschwind DH. Autism: many genes, common pathways? *Cell* 2008;35(3):391-5.
36. Coutinho JVSC, Bosso RMV. Autismo e genética: uma revisão de literatura. *Revista Científica do ITPAC* 2015 jan;8(1).
37. Scherer SW, Lee C, Birney E, [Eichler EE](#), [Carter NP](#), [Hurles ME](#), et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nature Genetics*. 2007;39(7):7-15.
38. Lins, T. C. L. Variação estrutural no número de cópias e sua implicação na expressão de microRNA em humanos. [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília;2014.
39. South S T, Lee C, Lamb AN, [Cordeiro AN](#), [Higgins AW](#), [Kearney HM](#). ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genetics in Medicine* 2013;15(11):901-9.
40. Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genetics*. 2017;8:449-57. Doi: 10.1007/s13353-017-0407-4.

41. Vermeesch J R, Brady P D, Sanlaville D, [Kok K](#), [Hastings RJ](#). Genome wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Human mutation* 2012;33(6):906-15.
42. El Khattabi LA, Heide S, Caberg J-H. 16p13.11 microduplication in 45 new patients: refined clinical significance and genotype–phenotype correlations. *J Med Genet* 2018. p. 1–7. Doi:10.1136/jmedgenet-2018-105389
43. Ribeiro, CM. Estudo de genes candidatos aos transtornos do espectro autista. [tese]. São Paulo:Universidade de São Paulo; 2013.
44. Moreira DP, Oliveira KG, Martins ALB, Lourenço NCV, Takahashi VNO, Rocha K, et al. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in Autism Spectrum Disorder Brazilian Individuals with and without Epilepsy. *Revista Plos ONE*. 2014;9(9).
45. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research* 2011;1380:42-77.
46. Genecards – Human Gene Database. 2017.
47. Ribas LT, Cunha MC. Correlação entre a idade paterna, nova mutação genética e autismo/esquiosofrenia infantil. *Disturb Comum* 2013;25(1).
48. Trost B, Walker S, Wang Z, [Thiruvahindrapuram B](#), [MacDonald JR](#), [Sung WWL](#), et al. A Comprehensive workflow for read depth-based identification of copy-number variation from whole-genome sequence data. *The American Journal of Human Genetics* 2018;102:142-55.
49. El-Baz F, Zaghoul MS, Sobky EE. Chromosomal abnormalities and autism. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2016;17:57-62.
50. Moreira DP, Griesi-Oliveira K, Bossolani-Martins AL, Lourenço NCV, Takahashi VNO, Rocha K, et al. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in Autism Spectrum Disorder Brazilian Individuals with and without Epilepsy. *Plos ONE* 2014;9(9).
51. Pinto D, Delaby E, Merico D, [Barbosa M](#), [Merikangas A](#), [Klei L](#) et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014;677-94.
52. Guivarch J, Chatel C, Mortreux J. An atypical autistic phenotype associated with a 2q13 microdeletion: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2018;12(79).
53. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012 ;22(3):229-37.

54. Hladilkova E, Baroy T, Fannemel M, [Vallova V](#), [Misceo D](#), [Bryn V](#), et al. A recurrent deletion on chromosome 2q13 is associated with developmental delay and mild facial dysmorphisms. *Mol Cytogenet* 2015;8(57).
55. Yu HE, Hawash K, Picker J. A recurrent 1.71Mb genomic imbalance at 2q13 increases the risk of developmental delay and dysmorphism. *Clin Genet* 2012;81(3): 257-64.
56. Riley KN, Catalano LM, Bernat JA, [Adams SD](#), [Martin DM](#), [Lalani SR](#), et al. Recurrent deletions and duplications of chromosome 2q11.2 and 2q13 are associated with variable outcomes. *Am J Med Genet A* 2015;167A(11):2664-73.
57. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 2012;367(14):1321-31.
58. Woodbury-Smith M, Paterson AD, O'Connor I. Genome-wide linkage study of autism spectrum disorder and the broad autism phenotype in extended pedigrees. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2018;10(20).
59. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(9):551-63.
60. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, [Bodea CA](#), [Goldberg AP](#), Lee AB et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet* 2014;46(8):881-5.
61. Hoang N, Cytrynbaum C, Scherer SW. Communicating complex genomic information: A counselling approach derived from research experience with Autism Spectrum Disorder. *Patient Education and Counseling* 2018;101:352-61,
62. Jacquemont S, Coe BP, Hersch M. A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. *The American Journal of Human Genetics.* 2014;94:415-25.
63. Vorstman JAS, Parr JR, Moreno-De-Luca D, [Anney RJJ](#), [Nurnberger JJ](#), [Hallmayer JF](#). Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics* 2017;18(6):362.
64. Liu X, Takumi T. Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014;452:244-53.
65. Hanish AE, Cohen MZ, Starr LJ. Autism spectrum disorder and genetic testing: Parental perceptions and decision-making *J Spec Pediatr Nurs* 2018;23.
66. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, [Junção A](#), [Wyder S](#), [Huerta-Cepas J](#), et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research.* 2019;47.

67. Menashe I, Larsen EC, Banerjee-Basu S. Prioritization of Copy Number Variation Loci Associated with Autism from AutDB-An Integrative Multi-Study Genetic Database PLoS ONE. 2013;8:e66707.
68. Rosenfeld JA, Stephens LE, Coppinger J. Deletions flanked by breakpoints 3 and 4 on 15q13 may contribute to abnormal phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2011;9:547-54.
69. Marini C, Cecconi A, Contini E, [Pantaleo H](#), [Metitieri t](#), [Guarducci S](#), et al. Clinical and genetic study of a family with a paternally inherited 15q11–q13 duplication. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2013;61(6):1459-64.
70. Noor A, Dupuis L, Mittal K, [Lionel AC](#), [Marshall CR](#), [Scherer SW](#), et al. 15q11.2 duplication encompassing only the UBE3A gene is associated with developmental delay and neuropsychiatric phenotypes. *Human mutation* 2015;36(7):689-93.
71. Chen C P, Lin SP, Lee CL, [Chern SR](#), [Wu PS](#), [Chen YN](#), et al. Familial transmission of recurrent 15q11.2 (BP1-BP2) microdeletion encompassing NIPA1, NIPA2, CYFIP1, and TUBGCP5 associated with phenotypic variability in developmental, speech, and motor delay. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2017; 56(1):93-97.
72. Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet.* 2011 Oct;130(4):517-28.
73. Mei C, Fedorenko E, Amor DJ, [Boys A](#), [Hoeflin C](#), [Carew P](#), et al. Deep phenotyping of speech and language skills in individuals with 16p11.2 deletion. *Eur J Hum Genet* 2018 May;26(5):676-86.
74. Gatti M, Tolva G, Bergamaschi S. Syndrome and 16p11.2 Recurrent Microdeletion: A Case Report and Review of the Literature. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2018 Oct;31(5):533-5.
75. Trisomy18p. [acesso 2019 Nov 01]. Disponível em: <https://hpo.jax.org/app/browse/disease/ORPHA:1715>.
76. Duplicação 18p.[acesso em 2019 nov 01]. Disponvel em: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=PT&data\\_id=340&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=18p&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Grupo%20de%20doen%E7as%20relacionadas=Duplicac-o-18p&title=Duplica%E7%E3o%2018p&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=PT&data_id=340&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=18p&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Grupo%20de%20doen%E7as%20relacionadas=Duplicac-o-18p&title=Duplica%E7%E3o%2018p&search=Disease_Search_Simple).
77. Orendi K, Uhrig S, Mach M, [Tschepper P](#), [Speicher MR](#). Complete and pure trisomy 18p due to a complex chromosomal rearrangement in a male adult with mild intellectual disability. *Am J Med Genet A* 2013;161A(7):1806-12.

78. Celestino-Soper PBS, Shaw CA, Sanders SJ, Li J, Murtha MT, [Ercan-Sencicek, AG](#), et al. Use of array CGH to detect exonic copy number variants throughout the genome in autism families detects a novel deletion in TMLHE. *Hum Molec Genet* 2011;20:4360-70.
79. Celestino-Soper PBS, Violante S, Crawford EL, Lui R, Lionel A, Delaby E, et al. A common X-linked inborn error of carnitine biosynthesis may be a risk factor for nondysmorphic autism. *Proc Nat Acad Sci* 2012;109:7974-81.
80. Ziats M N, Comeaux M S, Yang Y. Improvement of regressive autism symptoms in a child with TMLHE deficiency following carnitine supplementation. *Am. J. Med. Genet.* 167A: 2162-2167, 2015. Note: Erratum: *Am J Med Genet* 167A:2496 only, 2015
81. Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K, [Verbeeck J](#), [Zweier C](#), [Madrigal I](#), et al. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am J Hum Genet* 2009;85:809-22.
82. Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The MECP2 duplication syndrome. *Am J Hum Genet* 2010;152A:1079-88.
83. Shibayama A, Cook Jr EH, Feng J, Glanzman F. MECP2 structural and 3'-UTR variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: A possible association with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 2004;28(1):50-53.
84. Hamada N, Ito H, Nishijo T. Essential role of the nuclear isoform of RBFOX1, a candidate gene for autism spectrum disorders, in the brain development. *Sci Rep* 2016; 6:30805. Doi:10.1038/srep30805
85. Wamsley B, Jaglin XH, Favuzzi E, [Quattrococo G](#), [Nigro MJ](#), [Yusuf N](#), et al. RBFOX1, Mediates Cell-type-Specific Splicing in Cortical Interneurons. *Neuron* 2018;100(4):846-59.e7. Doi:10.1016/j.neuron.2018.09.026
86. Glessner JT, Li J, Wang D, [March M](#), [Lima L](#), [Desai A](#), et al. Copy number variation meta-analysis reveals a novel duplication at 9p24 associated with multiple neurodevelopmental disorders. *Genome Med* 2017;9(1):106. Doi:10.1186/s13073-017-0494-1.
87. Genes *CACNA1H* *CACNA1E* e *CACN2B*. [acesso em 201 Nov 03]. Disponível em: <https://www.genecards.org/>.
88. Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, Cherry A, Clamphan DE, Keating MT. CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *Journal of Biological chemistry* 2006;281(31):22085-91.

89. Breitenkamp AF, Matthes J, Nass RD, Sinzig J, Lehmkhul K, Numberg P, et al. Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PLoS One* 2014;9(4):e95579. Doi:10.1371/journal.pone.0095579.
90. O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012;485(7397):24650. Soi:10.1038/nature10989.
91. Shang L, Henderson LB, Cho MT, [Petrey DS](#), [Fong CT](#), [Haude KM](#), et al. De novo missense variants in PPP2R5D are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. *Neurogenetics* 2016;17(1):43-9. Doi:10.1007/s10048-015-0466-9.
92. Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, [Fukai R](#), [Miyatake S](#), [Koshimizu E](#), et al. Integrative analyses of de novo mutations provide deeper biological insights into autism spectrum disorder. *Cell reports* 2018;22(3):734-47.
93. Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. 2014;515(7526):216-221. Doi:10.1038/nature13908.
94. Geisheker MR, Heymann G, Wang T, [Coe BP](#), [Turner TN](#), [Stessman HAF](#), et al. Hotspots of missense mutation identify neurodevelopmental disorder genes and functional domains. *Nat Neurosci* 2017;20(8):1043-1051. Doi:10.1038/nn.4589.
95. Héroult J, Petit E, Martineau J. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of HRAS gene. *American journal of medical genetics* 1995;60(4): 276-81.
96. Pantaleoni F, Lev D, Cirstea IC, Motta, [Lepri FR](#), [Bottero L](#), et al. Aberrant HRAS transcript processing underlies a distinctive phenotype within the RASopathy clinical spectrum. *Human mutation* 2017; 38(7):798-804.
97. Johnson EM, Ishak AD, Naylor PE, [Stevenson DA](#), [Reiss AL](#), [Green T](#), et al. PTPN11 Gain-of-Function Mutations Affect the Developing Human Brain, Memory, and Attention. *Cerebral Cortex* 2018;29(7):2915-23. Doi: 10.1093/cercor/bhy158.
98. Balicza P, Varga NÁ, Bolgár B, Pentelényi K, Bencsik R, Gál A, et al. Comprehensive Analysis of Rare Variants of 101 Autism-Linked Genes in a Hungarian Cohort of Autism Spectrum Disorder Patients. *Front Genet* 2019;10:434. Doi:10.3389/fgene.2019.00434
99. Yuen RKC, Merico D, Bookman M, [Howe LJ](#), [Thiruvahindrapuram B](#), [Patel RV](#), et al. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat Neurosci* 2017;20(4):602-11. Doi:10.1038/nn.4524.

100. Cobben JM, Weiss MM, Van Dijk FS. A de novo mutation in ZMYND11, a candidate gene for 10p15.3 deletion syndrome, is associated with syndromic intellectual disability. *European journal of medical genetics* 2014;57(11-12): 636-8.
101. Eggert M, Müller S, Heinrich U, [Mehraein Y](#). A new familial case of microdeletion syndrome 10p15.3. *European journal of medical genetics* 2016;59(4):179-82.
102. Freed D, Pevsner J. The contribution of mosaic variants to autism spectrum disorder. *PLoS Genet* 2016;12(9):e1006245. Doi:10.1371/journal.pgen.1006245.
103. Witteveen JS, Willemsen MH, Dombroski TC, [Van Bakel NH](#), [Nillesen WM](#), [Van Hulten JA](#), et al. Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity. *Nature genetics* 2016;48(8): 877.
104. Popp B, Ekici AB, Thiel CT. Exome Pool-Seq in neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet* 2017;25(12):1364-76. Doi:10.1038/s41431-017-0022-1.
105. Wang J, Gong J, Li L. Neurexin gene family variants as risk factors for autism spectrum disorder. *Autism Research* 2018;11(1):37-43.
106. Yuan H, Wang Q, Liu Y, [Yang W](#), [He Y](#), [Gusella JF](#), et al. A rare exonic NRXN3 deletion segregating with neurodevelopmental and neuropsychiatric conditions in a three-generation Chinese family. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2018;177(6):589-95. Doi:10.1002/ajmg.b.32673.
107. Seto T, Hamazaki T, Nishigaki S. A novel CASK mutation identified in siblings exhibiting developmental disorders with/without microcephaly. *Intractable Rare Dis Res* 2017;6(3):177-82. Doi:10.5582/irdr.2017.01031.
108. Aspromonte MC, Bellini M, Gasparini A, [Carraro M](#), [Bettella E](#), [Polli R](#), et al. Characterization of intellectual disability and autism comorbidity through gene panel sequencing. *Human mutation* 2019; 40(9):1346-63. Doi: 10.1002/humu.23822.
109. Wong WR, Brugman KI, Maher S, [Oh JY](#), [Howe K](#), [Kato M](#), et al. Autism-associated missense genetic variants impact locomotion and neurodevelopment in *Caenorhabditis elegans*. *Human Molecular Genetics* 2019;28(13): 2271-81.
110. Parente DJ, Garriga C, Baskin B. Neuroligin 2 nonsense variant associated with anxiety, autism, intellectual disability, hyperphagia, and obesity. *American journal of medical genetics Part A* 2017;173(1):213-16.
111. Krumm N, Turner TN, Baker C. Excesso de mutações truncadas herdadas e raras no autismo. *Nat Genet* 2015; 47(6):582-8. Doi: 10.1038 / ng.3303.



112. Yu J, He X, Yao D, [Li Z](#), [Li H](#), [Zhao Z](#). A sex-specific association of common variants of neuroligin genes (NLGN3 and NLGN4X) with autism spectrum disorders in a Chinese Han cohort. *Behav Brain Funct* 2011;7:13. Doi:10.1186/1744-9081-7-13.
113. Jamain S, Quach H, Betancur C. Mutações dos genes ligados ao X que codificam as neuroliginas NLGN3 e NLGN4 estão associadas ao autismo. *Nat Genet.* 2003; 34 (1): 27-9. Doi: 10.1038 / ng1136.
114. Quartier A, Courraud J, Thi Ha T. Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. *Human Mutation.* 2019 Nov;40(11):2021-32. Doi: 10.1002/humu.23836.
115. Bai Y, Qiu S, Li Y. Genetic association between SHANK2 polymorphisms and susceptibility to autism spectrum disorder. *IUBMB life* 2018;70(8):763-76.
116. Zaslavsky K, Zhang WB, McCreedy FP. SHANK2 mutations associated with autism spectrum disorder cause hyperconnectivity of human neurons. *Nat Neurosci.* 2019;22(4):556-64. Doi:10.1038/s41593-019-0365-8.
117. Wang T, Guo H, Xiong B. De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nat Commun* 2016;7:13316. Doi:10.1038/ncomms13316.
118. Yuge K, Iwama K, Yonee C, [Matsufuji M](#), [Sano N](#), [Saikusa T](#), et al. A novel STXBP1 mutation causes typical Rett syndrome in a Japanese girl. *Brain and Development* 2018;40(6):493-7.
119. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, [Biesecker LG](#), [Brothman AR](#), [Carter NP](#), et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics* 2010; 86(5): 749-64.
120. Painel de genes – Centogene.[2019 dez 08]. Disponível em: <https://www.centoport.com/order/new/panels-arrays/analysis/method?search=Syndromic%20autism%20panel>.



**HEREDOGRAMA**

	Tamanho em kb	Número de genes	Interpretação	Genes

Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

## APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “**Estudo de CNVs em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array**”. Nesta pesquisa pretendemos estudar as CNVs (Variações no número de cópias do DNA) encontradas no exame de SNP-array como possíveis causadoras do Transtorno do Espectro Autista (TEA). O motivo que nos leva a essa pesquisa é a grande quantidade de casos de TEA que não apresentam causa esclarecida, sendo as CNVs associadas à expressão deste transtorno.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Após o Sr (a) conceder a permissão para utilização do seu questionário clínico preenchido pelo senhor (a) no momento da realização do exame, seu relatório médico para solicitação do exame e resultado de exame genético de microarray, será preenchida uma ficha específica para a pesquisa com os dados: idade, sexo, presença ou não de parentesco na família, dados clínicos e o resultado do exame genético de microarray sem a identificação do seu nome. Esses dados genéticos serão avaliados em bancos de dados genômicos públicos e a literatura científica. Após o fim da pesquisa será escrito um trabalho científico com os resultados, bem como a sua publicação em revista científica. O risco presente neste estudo é de vazamento de dados sigilosos, entretanto serão tomadas medidas de precaução como a coleta de dados de forma anônima. As fichas utilizadas na pesquisa serão guardadas em local seguro e serão avaliados somente pela Pesquisadora responsável e sua Orientadora.

O benefício desta pesquisa será a contribuição destes dados para melhor entendimento dos fatores que levam ao desenvolvimento do Transtorno do Espectro Autista. Isso pode ajudar os profissionais de saúde a desenvolver novas formas de auxiliar seus pacientes. Para participar deste estudo o (a) Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Caso o (a) Sr.(a) venha a sofrer algum dano resultante da pesquisa o Sr.(a) tem direito à indenização por parte do pesquisador e as instituições envolvidas.

O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo DNA- Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular.

Caso o (a) Sr.(a) tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento ou ainda deseje retirar-se da pesquisa, por favor, entre em contato com os pesquisadores abaixo a qualquer tempo: Mestranda (Assistente da pesquisa) - Camila Capinam Pereira de Jesus e a Pesquisadora responsável (Orientadora) - Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho - Laboratório de Genética Humana e Mutagênese do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia localizado na Rua. Barão de Geremoabo, 668 - Ondina, Salvador - BA, 40170-115 - Telefone 71-3283-6540 e 3283-6541.

Também em caso de dúvida, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA). O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) busca defender os interesses dos participantes de pesquisa. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA) está localizado na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – 4º andar, Vale do Canela. Horário de funcionamento: Segunda das 13:30h às 19:30h e de terça à sexta das 7:00h às 13:00h. Telefone: (71) 3283-8951. E-mail: cepics@ufba.br.

Após a finalização da pesquisa os resultados estarão à sua disposição através do contato com as pesquisadoras envolvidas. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O(a) Sr.(a) não será identificado em nenhuma publicação dessa pesquisa. As fichas com os dados do paciente serão identificadas através de um número.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, rubricadas em todas as suas páginas, as quais serão assinadas, ao seu término, pelo (a) Sr (a) ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável. Uma das vias deste termo será arquivada pelo pesquisador responsável, no DNA – Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular e a outra via será fornecida ao(a) Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de cinco (5) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “**Estudo de CNVs em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Nome	completo (participante)	Data
Nome	completo (pesquisador responsável)	Data

## APÊNDICE C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – RESPONSÁVEL PELO MENOR E/OU ADULTO INCAPAZ.



**Universidade Federal da Bahia**

**Instituto de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Responsável pelo menor e/ou adulto incapaz)

O(a) menor e/ou adulto incapaz \_\_\_\_\_, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “**Estudo de CNVs em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array**”. Nesta pesquisa pretendemos estudar as CNVs (Variações no número de cópias do DNA) encontradas no exame de SNP-array como possíveis causadoras do Transtorno do Espectro Autista (TEA). O motivo que nos leva a essa pesquisa é a grande quantidade de casos de TEA que não apresentam causa esclarecida, sendo as CNVs associadas à expressão deste transtorno.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Após o Sr (a) conceder a permissão para utilização do questionário clínico do seu filho/filha preenchido pelo senhor (a) no momento da realização do exame, o relatório médico dele para solicitação do exame e resultado de exame genético de microarray do seu filho/filha, será preenchida uma ficha com os dados: idade, sexo, presença ou não de parentesco na família, dados clínicos e o resultado do exame genético de microarray sem a identificação do nome do seu filho/filha. Esses dados genéticos serão avaliados em bancos de dados genômicos públicos e a literatura científica. Após o fim da pesquisa será escrito um trabalho científico com os resultados, bem como a sua publicação em revista científica. O risco presente neste estudo é de vazamento de dados sigilosos, entretanto serão tomadas medidas de precaução como a coleta de dados de forma anônima. As fichas utilizadas na pesquisa serão guardadas em local seguro e serão avaliados somente pela Pesquisadora responsável e sua Orientadora.

O benefício desta pesquisa será a contribuição destes dados para ajudar no entendimento dos fatores que levam ao desenvolvimento do Transtorno do Espectro Autista. Isso pode ajudar os profissionais de saúde a desenvolver novas formas de auxiliar seus pacientes. Para participar deste estudo o(a) menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Caso o menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade venha a sofrer algum dano resultante da pesquisa o seu filho/filha tem assegurado direito à indenização por parte do pesquisador e as instituições envolvidas.

O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para permitir a participação ou recusar a participação do seu filho/filha. O Sr(a) como responsável pelo menor ou adulto incapaz poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação do seu filho/filha a qualquer momento. A participação dele(a) é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo DNA- Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular. que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Caso o Senhor(a) tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento ou ainda deseje retirar o consentimento de participação do menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade da pesquisa, por favor, entre em contato com os pesquisadores abaixo a qualquer tempo: Mestranda (Assistente da pesquisa) - Camila Capinam Pereira de Jesus e a Pesquisadora responsável (Orientadora) - Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho - Laboratório de Genética Humana e Mutagênese do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia localizado na Rua. Barão de Geremoabo, 668 - Ondina, Salvador - BA, 40170-115 - Telefone 71-3283-6540 e 3283-6541.

Também em caso de dúvida, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA). O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) busca defender os interesses dos participantes de pesquisa. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA) está localizado na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – 4º andar, Vale do Canela. Horário de funcionamento: Segunda das 13:30h às 19:30h e de terça à sexta das 7:00h às 13:00h. Telefone: (71) 3283-8951. E-mail: cepics@ufba.br.

Após a finalização da pesquisa os resultados estarão à sua disposição através do contato com as pesquisadoras envolvidas. O nome do menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar. As fichas com os dados do paciente serão identificadas através de um número.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, no DNA – Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular e a outra via será fornecida ao (a) Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade do menor ou adulto incapaz sob sua responsabilidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ responsável pelo Menor \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa “**Estudo de CNVS em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de consentimento de participação do Menor sob minha responsabilidade, se assim o desejar. Se o menor sob minha responsabilidade tiver idade igual ou inferior a 06 anos ou for legalmente incapaz, comprometo-me em esclarecer ao menor sob a minha responsabilidade os objetivos e etapas desta pesquisa de forma clara e adequada a sua idade antes, antes da sua inclusão neste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

---

Nome completo (participante)

Data

---

Nome completo (pesquisador responsável)

Data

---

Nome completo (testemunha)

Data

Em caso de desistência do Menor sob minha responsabilidade em permanecer na pesquisa, autorizo que os seus dados já coletados referentes a resultados de exames, questionários respondidos e similares ainda sejam utilizados na pesquisa, com os mesmos propósitos já apresentados neste TCLE.

---

Nome completo (participante)

Data



## APÊNDICE D: TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “**Estudo de CNVs em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array**”. Nesta pesquisa vamos estudar algumas alterações que podem existir no seus genes e que estejam causando o seu problema de saúde. O motivo que nos leva a essa pesquisa é a grande quantidade de pacientes que não sabem as causas do seu problema de saúde.

Se você e seu pai, mãe e/ou responsável aceitarem participar do estudo e deixarem os pesquisadores usarem essas informações, que seus pais e o médico escreveram sobre você, e as informações do seu exame, vamos preencher um papel chamado ficha. Nessa ficha terá sua idade, sexo, se existem outras pessoas parecidas na família, a descrição do seu problema de saúde e o resultado desse exame, que você está fazendo agora, sem a identificação do seu nome. Toda essa informação será comparada com informações de outras pessoas e nos livros de ciências da saúde. Após o fim da pesquisa teremos os resultados e esses resultados serão mostrados em revistas de ciências da saúde para ajudar aos médicos e pesquisadores a conhecer melhor as causas dessa doença. O risco presente neste estudo é saberem o seu nome, mas para isso os seus dados serão usados sem a sua identificação. As fichas utilizadas na pesquisa serão guardadas em local seguro e serão avaliados somente pela Pesquisadora responsável e sua Orientadora.

O lado bom desta pesquisa será a ajuda destas informações para entender o que leva ao desenvolvimento dessa doença. Isso ajudará os médicos a tentar conseguir novas formas de ajudar seus pacientes.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá pagamento por isto. Se você sofrer algum dano resultante de sua participação na pesquisa você terá direito à indenização.

Você e seus pais ou responsáveis terão explicação sobre o estudo e deverão tirar qualquer dúvida, sendo livres para participar ou não da pesquisa. Você poderá tirar sua autorização ou interromper a participação em qualquer momento. A sua participação é livre e se você não quiser participar não terá nenhuma punição ou mudança na forma em que você é atendido pelo laboratório onde está realizando o exame (DNA- Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular).

Se você ou seus pais ou responsáveis tiver alguma dúvida ou precisar de alguma explicação ou se você quiser sair da pesquisa, por favor, entre em contato ou peça pra seus pais ou responsáveis entrar em contato com os pesquisadores abaixo a qualquer tempo:

Mestranda (Assistente da pesquisa) - Camila Capinam Pereira de Jesus e a Pesquisadora responsável (Orientadora) - Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho - Laboratório de Genética Humana e Mutagênese do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia localizado na Rua. Barão de Geremoabo, 668 - Ondina, Salvador - BA, 40170-115 - Telefone 71-3283-6540 e 3283-6541.

Também em caso de dúvida, você ou seus pais ou responsáveis poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA). O Comitê de Ética

em Pesquisa (CEP) busca defender os interesses dos participantes de pesquisa. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA) está localizado na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – 4º andar, Vale do Canela. Horário de funcionamento: Segunda das 13:30h às 19:30h e de terça à sexta das 7:00h às 13:00h. Telefone: (71) 3283-8951. E-mail: cepics@ufba.br.

Após a finalização da pesquisa os resultados estarão à sua disposição através do contato com as pesquisadoras envolvidas. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado em nenhuma publicação dessa pesquisa. As fichas com os seus dados serão identificadas através de um número.

Este termo de consentimento é impresso em duas vias originais, assinadas em todas as suas páginas, e no final da folha por você, assim como pelo pesquisador responsável. Uma das vias deste termo será arquivada pelo pesquisador responsável, no DNA – Centro Laboratorial de Genética e Biologia Molecular e a outra via será entregue a você. Os dados e utilizados na pesquisa vão ficar guardados com o pesquisador responsável por um período de cinco (5) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores vão tratar da sua identidade com todo o sigilo profissional necessário, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.


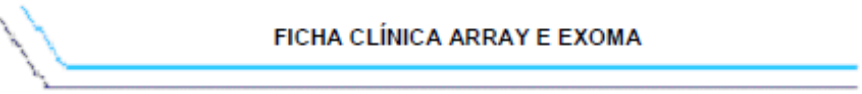
Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de Identidade \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos deste trabalho, de maneira clara e detalhada e não tenho dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei pedir novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se achar melhor para mim. Tendo a autorização em participar do(a) meu(minha) responsável já assinada, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste documento assinado.

Salvador, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

## ANEXO A: FICHA CLÍNICA – LABORATÓRIO DNA

	 <p style="text-align: center;">FICHA CLÍNICA ARRAY E EXOMA</p>
---	---

### E TERMO DE CONSENTIMENTO PARA ANÁLISES GENÉTICAS

**Testes:**

- (  ) Análise de microarray cromossômico (SNP-array ou CGH-array).  
 (  ) Exoma do genoma completo.

**Tecido:**

- (  ) Sangue periférico      (  ) tecido fetal      (  ) material de abortamento

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

NOME DO RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

(CASO DE MENOR)

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_ (M) \_\_\_ (F)

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

CIDADE: \_\_\_\_\_ PAÍS: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

TELEFONE: \_\_\_\_\_ E-MAIL: \_\_\_\_\_

**INFORMAÇÕES CLÍNICAS:**

Suspeita clínica: \_\_\_\_\_

Idade de manifestação: \_\_\_\_\_

História familiar de consanguinidade? \_\_\_ (Sim) \_\_\_ (não)

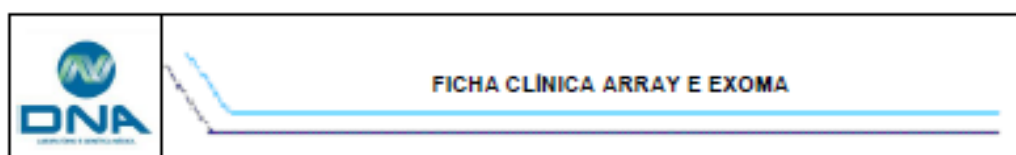
Irmãos afetados? \_\_\_ (não) \_\_\_ (sim) Quantos? \_\_\_\_\_

Parentes afetados? \_\_\_ (não) \_\_\_ (sim) Quais? \_\_\_\_\_

Realizou transfusão de sangue nos últimos 90 dias? (  ) Sim      (  ) Não

**PREENCHER FICHA CLÍNICA ABAIXO OU ANEXAR RELATÓRIO MÉDICO.**

**OS DADOS CLÍNICOS SÃO EXTREMAMENTE IMPORTANTES PARA INTERPRETAÇÃO DO EXAME GENÉTICO**



## FICHA CLÍNICA

(Preenchimento obrigatório para exame de exoma)

Marcar as características presentes no paciente:

### A-Neurologia


- 1- Anormalidades comportamentais
  - a. Autismo
  - b. Déficit de atenção
  - c. Desordens psiquiátrica
- 2- Imagem cerebral
  - a. Mielinização anormal
  - b. Giro cortical anormal
  - c. Agenesia de corpo caloso
  - d. Atrofia cerebral
  - e. Hipoplasia cerebelar
  - f. Heterotopia
  - g. Holopresencefalia
  - h. Hidrocefalia
  - i. Leucodistrofia
  - j. Lissencefalia
- 3- Perda de desenvolvimento
  - a. Motor
  - b. Linguagem
  - c. Regressão desenvolvimental
  - d. Deficiência intelectual
- 4- Anormalidade dos movimentos
  - a. Ataxia
  - b. Chorea
  - c. Distonia
  - d. Parkinsonismo
- 5- Anormalidades neuromuscular
  - a. Hipotonia muscular
  - b. Hipertonia Muscular
  - c. Hiperreflexia (excesso de reflexos)
  - d. Espasticidade (aumento do tônus muscular)
- 6- Convulsão
  - a. Febril
  - b. Focal
  - c. Generalizada
- 7- Outras
  - a. Craniossinostose
  - b. Demência
  - c. Encefalopatia
  - d. Dor de cabeça/enxaqueca
  - e. Macrocefalia
  - f. Microcefalia
  - g. Neuropatia
  - h. Acidente vascular encefálico

### B-Metabolismo


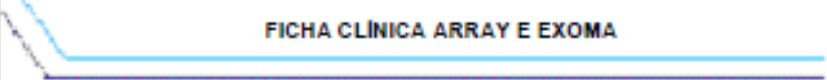
- 1- Creatina quinase anormal
- 2- Diminuição da carnitina plasmática
- 3- Hiperalaninemia
- 4- Hipoglicemia
- 5- Aumento do piruvato no soro
- 6- Cetoses
- 7- Acidoses lácticas
- 8- Acidúria orgânica
- 9- Outras alterações metabólicas: \_\_\_\_\_

### C- Oftalmologia

- 1- Biefaroespasmio
- 2- Catarata
- 3- Coloboma

	<b>FICHA CLÍNICA ARRAY E EXOMA</b>
---	------------------------------------


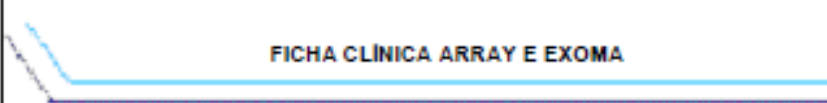
- 4- Glaucoma
- 5- Microftalmos
- 6- Nistagmos
- 7- Oftalmoplegia
- 8- Atrofia óptica
- 9- Ptosis
- 10- Retinite pigmentosa
- 11- Retinoblastoma
- 12- Estrabismo
- 13- Comprometimento visual
- D- Boca, garganta e orelha**
  - 1- Anormalidade na cor dos dentes
  - 2- Fissura palatal, labial
  - 3- Comprometimento do canal auditivo
  - 4- Malformação da orelha externa
  - 5- Hipodontia
  - 6- Comprometimento sensorial auditivo
- E- Pele, esqueleto**
  - 1- Esqueleto
    - a. Morfologia dos membros anormal
    - b. Sistema esquelético anormal
    - c. Problemas vertebrais
    - d. Hiper mobilidade de juntas
    - e. Contraturas articulares múltiplas
    - f. Polidactilia
    - g. Escoliose
    - h. Sindactilia
    - i. Talipes equinovarus
  - 2- Pele
    - a. Pigmentação anormal
    - b. Cabelo anormal
    - c. Unhas anormais
    - d. Hiperextensibilidade de pele
    - e. Ictiose
- F- Cardiovascular**
  - 1- Angioedema
  - 2- Dilatação aórtica
  - 3- Arritmia
  - 4- Coarctação da aorta
  - 5- Defeito do septo atrial
  - 6- Defeito do septo ventricular
  - 7- Miocardiopatia dilatada
  - 8- Hipertensão
  - 9- Hipertrofia, cardiomiopatia
  - 10- Hipotensão
  - 11- Linfedema
  - 12- Malformação de coração e grandes vasos
  - 13- Infarto do miocárdio
  - 14- Tetralogia de Fallot
  - 15- Vasculite
- G- Gastrointestinal, Genitourinário, Endócrino**
  - 1- Gastrointestinal
    - a. Megacólon Agangliônico
    - b. Constipação
    - c. Diarréia
    - d. Transaminases hepáticas altas
    - e. Gastroquise
    - f. Deficiência hepática
    - g. Hepatomegalia
    - h. Obesidade
    - i. Estenose pilórica
    - j. Vômitos
  - 2- Genitourinário
    - a. Morfologia anormal dos rins

	 <p style="text-align: center;"><b>FICHA CLÍNICA ARRAY E EXOMA</b></p>
---	--

- b. Sistema urinário anormal
  - c. Hidronefrose
  - d. Agenesia renal
  - e. Cisto renal
  - f. Disfunção tubular renal
- 3- Endócrino
- a. Diabetes mellitus
  - b. Hipo/Hipertireoidismo
  - c. Hipo/Hiperparatireoidismo
- H- Aparelho Reprodutor**
- 1- Genitália externa anormal
  - 2- Genitália interna anormal
  - 3- Hipogonadismo
  - 4- Hipospadia
  - 5- Infertilidade
- I- Oncologia**
- 1- Polipose adenomatosa
  - 2- Câncer de mama
  - 3- Carcinoma colorretal
  - 4- Leucemia
  - 5- Miofibrose
  - 6- Neoplasia pulmonar
  - 7- Paraganglioma
  - 8- Feocromocitoma
- J- Hematologia e Imunologia**
- 1- Anormalidade de coagulação
  - 2- Anemia
  - 3- Imunodeficiência
  - 4- Neutropenia
  - 5- Pancitopenia
  - 6- Hemoglobina anormal
  - 7- Esplenomegalia
  - 8- Trombocitopenia
- K- Pré-natal e desenvolvimento**
- 1- Características faciais dismórficas
  - 2- Insuficiência de crescimento
  - 3- Hemihipertrofia
  - 4- Hidropisia fetal
  - 5- Retardo de crescimento intra-uterino
  - 6- Oligohidrâmnio
  - 7- Polihidrâmnio
  - 8- Baixa estatura
  - 9- Alta estatura

---

OUTRAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS QUE ACHAR NECESSÁRIO:

	 <p><b>FICHA CLÍNICA ARRAY E EXOMA</b></p>
---	--

## TERMO DE CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE GENÉTICA

É obrigatório garantir que o paciente tenha assinado o seu consentimento para a realização da análise genética.

Gostaríamos de explicar-lhe quais os objetivos destas análises, o que acontece com um teste genético e a importância dos resultados para você e sua família:

Um teste genético tem como objetivo estudar o material hereditário (DNA) utilizando uma análise molecular e genética de características que podem ser a causa da doença que o afeta ou que suspeite em você ou em sua família. Em uma análise genética, características genéticas individuais para uma suspeita específica ou muitas características genéticas são investigadas ao mesmo tempo.

O material de estudo normalmente é uma amostra de sangue. Em geral não existem riscos para a saúde na coleta, podendo ocorrer hematomas em torno da área de coleta.

### Importância dos resultados:

Se um resultado característico de uma doença é demonstrado, este resultado é altamente conclusivo. Se nenhuma mutação é encontrada associada à doença, mudanças genéticas responsáveis pela doença podem ainda existir. Uma doença genética ou predisposição para uma doença não pode, portanto, ser completamente excluída.

Às vezes, variantes genéticas são descritas, porém os seus significados não são totalmente claros. Isso é indicado nos resultados que será discutido com seu médico. Uma explicação completa de todas as possíveis causas de doenças devido a razões genéticas não é possível. Também não é possível a exclusão de todos os riscos de doença para você ou os membros da sua família (especialmente seus filhos) utilizando análises genéticas.

### Resultados incidentais:

Para testes de visão global do genoma, podem ocorrer resultados que não estão diretamente relacionados com o problema atual, mas que, no entanto, podem ser clinicamente importantes para você ou sua família. Esses resultados são chamados de **incidentais** que podem estar relacionados com um risco aumentado de doenças (de que você pode não estar ciente) potencialmente graves, inevitáveis ou intratáveis. Como parte do seu termo de consentimento, você pode decidir se gostaria, e como, de ser informado sobre tais resultados incidentais.

Se vários membros da família são testados, uma correta interpretação dos resultados depende das relações assumidas estarem corretas. Caso surja qualquer dúvida sobre a relação familiar observada durante o curso da análise genética, nós não o informaremos. Uma exceção é feita se for absolutamente necessário para a conclusão do teste requerido.

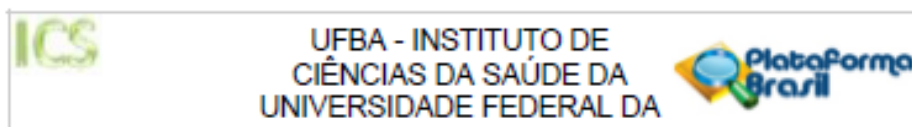
Os dados pessoais e resultados médicos serão armazenados por 5 anos com o consentimento assinado. Esses dados estão sujeitos a sigilo médico, que só podem ser liberados por mim de forma escrita. Os resultados do teste também podem ser utilizados para a pesquisa e para melhorar o diagnóstico e o tratamento de doenças genéticas. Neste caso, seus dados serão anonimizados.

Eu recebi, li e compreendi uma explicação escrita sobre o teste genético que estou realizando. Recebi explicações apropriadas sobre o objetivo e limitações do teste genético a ser realizado incluindo os riscos associados à coleta de sangue.

Local, Data \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente \_\_\_\_\_  
(Ou responsável legal)

## ANEXO B: PARECER CONSUBSTANCIADO – APROVAÇÃO CEP/ICS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de CNVs em pacientes com Transtorno do Espectro Autista utilizando SNP-array.

**Pesquisador:** ACACIA FERNANDES LACERDA DE CARVALHO

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 3

**CAAE:** 97907018.0.0000.5662

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

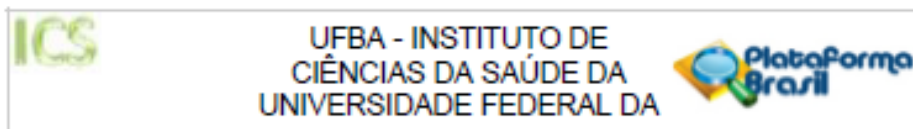
**Número do Parecer:** 3.216.010

#### Apresentação do Projeto:

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um grupo de condições caracterizadas por alteração no comportamento social, comunicação e linguagem e por um repertório restrito, estereotipado e repetitivo de interesses e atividades. Normalmente os sintomas começam a ser percebidos nos 03 primeiros anos de vida e continuam por toda a idade adulta desses indivíduos. A maioria dos pacientes que possuem TEA apresenta alto comprometimento intelectual, entretanto alguns casos podem apresentar altas habilidades cognitivas. A etiologia do autismo sem associação síndrome ainda permanece desconhecida, entretanto muitas vertentes têm proposto uma associação de fatores genéticos e ambientais como uma das principais causas para o desenvolvimento do TEA. As Variações no Número de Cópias (CNVs) são alterações genômicas com pelo menos 1kb de extensão e envolve ganhos ou perdas (duplicações ou deleções) quando comparados ao genoma de referência e tem sido citadas em inúmeros trabalhos científicos como uma das principais possíveis causas do TEA. Nos principais países mais desenvolvidos a pesquisa de CNVs através da técnica de Microarrays - SNParray tem sido amplamente utilizada como teste inicial para confirmação do diagnóstico do TEA, mostrando a eficácia deste teste e sua possível incorporação aos sistemas de saúde como principal exame para diagnóstico do autismo. Esses exames que pesquisam CNVs apontaram uma ocorrência de 10 a 20% de CNVs em indivíduos com TEA. Os

**Endereço:** Miguel Calmon  
**Bairro:** Vale do Canela  
**UF:** BA **Município:** SALVADOR **CEP:** 40.110-002  
**Telefone:** (71)3283-8951 **E-mail:** cepics@ufba.br





Continuação do Parecer: 3.216.010

cromossomos 15, 16 e 22 são os mais relacionados às CNVs presentes em pacientes autistas sendo as regiões q11-q13, p11.2 e q13, respectivamente, encontradas em 3 a 5% dos indivíduos afetados. O teste de microarray para o diagnóstico de CNVs em pacientes com TEA é uma proposta promissora para um melhor entendimento deste transtorno permitindo uma melhor compreensão da expressão gênica neste pacientes para que haja novas terapias para uma melhor qualidade de vida destes pacientes.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Estudar CNVs envolvidas na etiologia do TEA.

Objetivo Secundário:

- Entender a associação das CNVs detectadas com o TEA
- Descrever as CNVs associadas ao TEA contribuindo com a construção de painéis de genes.
- Analisar genealogias buscando consanguinidade e recorrência nas famílias.
- Traçar o perfil clínico associado as CNVs detectadas nos pacientes estudados com TEA.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Vazamento de dados sigilosos. Entretanto este risco será minimizado através da coleta anônima dos dados.

Benefícios:

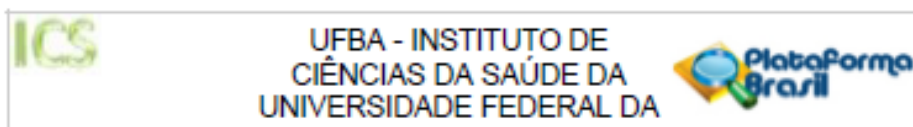
Benefícios Indiretos através dos resultados científicos obtidos na pesquisa que poderão contribuir para a compreensão do TEA.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de resposta ao Parecer CEP ICS nº 3.181.487, de 02 de março de 2019.

O projeto respeita o princípio da autonomia garantindo a privacidade, liberdade e dignidade dos participantes, bem como oferece benefícios, uma vez que os resultados científicos obtidos na pesquisa poderão contribuir para a compreensão do TEA.

Endereço: Miguel Calmon	
Bairro: Vale do Carreta	CEP: 40.110-902
UF: BA	Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8951	E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 3.216.010

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

Enviar os relatórios parciais a cada seis meses e o final ao término do estudo. (Norma Operacional nº 001/2013)

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

7) Rever o Cronograma ajustando as datas previstas a partir da análise em CEP e além disso, os dados constantes em todos os documentos cabíveis devem ser iguais em teor e prazos. Portanto, em cada documento onde consta o Cronograma, as informações devem ser iguais. A autora fez adequação do Cronograma, contudo o prazo para a execução da coleta de dados deve ser revista considerando emissão de parecer por este CEP.

Desta forma esta pendência não foi respondida e precisa ser corrigida.

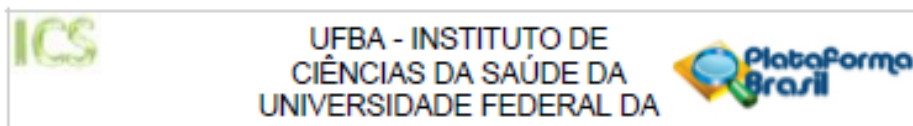
RESPOSTA: "Foram realizadas as alterações no cronograma em que foi acrescentado o mês de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril para análise do CEP e a coleta de dados iniciando somente em Maio. Estas alterações estão em realce amarelo no cronograma contido no projeto (pág. 11) e no documento Cronograma\_Projeto\_TEA\_Modificado 2."

**ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde (CEP-ICS/UFBA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional CNS nº. 001 de 2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Eventuais modificações no protocolo ou extensão do cronograma devem ser apresentadas ao CEP-ICS/UFBA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas por meio de emenda. Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, a cada 6 meses e ao término do estudo. O participante tem a liberdade de recusar-se a entrar no estudo ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d). O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após

Endereço: Miguel Calmon  
 Bairro: Vale do Carreta CEP: 40.110-002  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



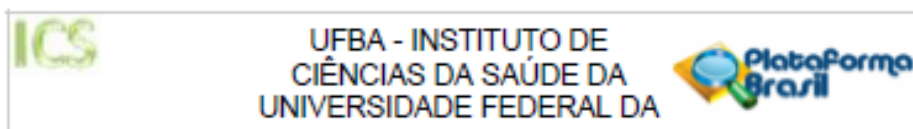
Continuação do Parecer: 3.216.010

análise das razões pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3). O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1154774.pdf	18/03/2019 23:12:48		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Projeto_TEA_Versao2.pdf	18/03/2019 23:11:05	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_TEA_Modificado_Versao2.pdf	18/03/2019 23:09:30	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto_TEA_Modificado_Versao2.pdf	18/03/2019 23:08:26	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Equipe_detalhada_projeto_TEA_Modificado.pdf	08/12/2018 20:15:07	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Questionario_clinico_do_laboratorio_DNA_para_realizacao_do_exame.pdf	08/12/2018 20:12:54	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor_Projeto_TEA_Modificado.pdf	08/12/2018 19:58:14	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_TEA_Modificado.pdf	08/12/2018 19:57:48	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_Projeto_TEA_Modificado.pdf	08/12/2018 19:57:26	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidade_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:14:40	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:14:03	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Ficha_clinica_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:13:05	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito

Endereço: Miguel Calmon  
 Bairro: Vale do Cardeal CEP: 40.110-002  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 3.216.010

Outros	Declaracao_de_Confidencialidade_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:11:56	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:09:24	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:08:52	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Projeto_TEA.pdf	26/08/2018 22:03:34	CAMILA CAPINAM PEREIRA DE JESUS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 22 de Março de 2019

---

Assinado por:  
DANIEL DOMINGUEZ FERRAZ  
(Coordenador(a))

Endereço: Miguel Calmon  
Bairro: Vale do Canela CEP: 40.110-002  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3283-8951 E-mail: cepics@ufba.br



Instituto de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsystem.ics.ufba.br>