

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: SAÚDE DA CRIANÇA E DO**  
**ADOLESCENTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PESQUISA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES COM**  
**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) EM UMA AMOSTRA DE**  
**MINAS GERAIS, BRASIL: UMA AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR**

**ALUNA: Michele da Silva Gonçalves**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Janaina Matos Moreira**

**COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho**

**Belo Horizonte - MG**

**Fevereiro de 2019**

**MICHELE DA SILVA GONÇALVES**

**PESQUISA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES COM  
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) EM UMA AMOSTRA DE  
MINAS GERAIS, BRASIL: UMA AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Janaina Matos Moreira**

**COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte – MG**

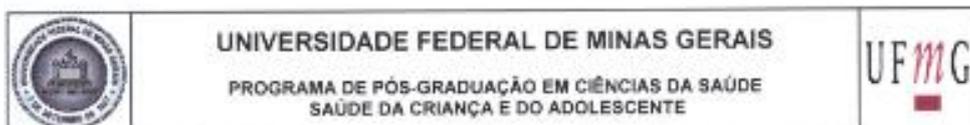
**2019**

G643      Gonçalves, Michele da Silva.  
Pesquisa de alterações genéticas em pacientes com transtorno do espectro autista (tea) em uma amostra de Minas Gerais, Brasil [manuscrito]: uma avaliação genético-molecular. / Michele da Silva Gonçalves. - - Belo Horizonte: 2019.  
148f.: il.  
Orientador (a): Janaina Matos Moreira.  
Coorientador (a): Maria Raquel Santos Carvalho.  
Área de concentração: Genética Humana.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Transtorno Autístico. 2. Transtorno do Espectro Autista. 3. Transtornos Cromossômicos. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Moreira, Janaina Matos. II. Carvalho, Maria Raquel Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QS 677

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



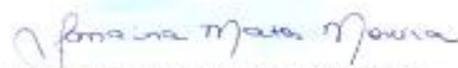
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ALTERAÇÕES NAS COPY NUMBER VARIATION (CNV) EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) EM UMA AMOSTRAGEM MINEIRA**

### MICHELE DA SILVA GONÇALVES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

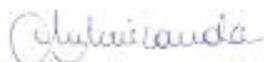
Aprovada em 20 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof.<sup>a</sup> Janaina Matos Moreira - Orientadora  
UFMG



Prof.<sup>a</sup> Maria Raquel Santos Carvalho - Coorientadora  
UFMG



Prof.<sup>a</sup> Débora Marques de Miranda  
UFMG



Prof. Marcelo Rizzatti Luizon  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2019

*Dedico este trabalho às pessoas a quem tenho maior amor e gratidão, minha família, meu marido e aqueles que diretamente contribuíram para conquista deste sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos pacientes e seus familiares, que se disponibilizaram prontamente a participar da pesquisa.

À minha orientadora Janaina, pelos ensinamentos e principalmente pela parceria. Sem você não teria conseguido desenvolver esta pesquisa.

À minha coorientadora Maria Raquel, pela orientação na parte genética e a grande troca de conhecimentos.

A Dra. Anisse pela dedicação nas avaliações morfológicas, e todo o carinho durante este processo.

Ao Laboratório Hermes Pardini, principalmente ao Dr. Alessandro, por me proporcionar esta pesquisa.

A Fabiana e aos colegas da citogenética da Genética Molecular, agradeço muito pelas análises citogenéticas. Sem vocês não conseguiria realizar os cariótipos.

As colegas de trabalho do Laboratório Hermes Pardini pela dicas e cumplicidade durante o desenvolvimento da pesquisa.

A coordenação do Departamento de Genética Molecular, Amanda e Nancy pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa durante estes anos.

À minha equipe de doença genética humana, base fundamental para procura de conhecimento.

Aos responsáveis e colaboradores do Ambulatório de Autismo do Hospital Borges da Costa, principalmente ao Dr. Felipe.

Ao grupo de trabalho desta pesquisa; Adriana, Nathalia e Luiz, agradeço muito o apoio na coleta do ambulatório e dos prontuários.

## SUMÁRIO

### LISTAS DE ABREVIACÕES, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA

### LISTAS DE ANEXOS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

1. Introdução	19
1.1 Transtorno do Espectro Autista: conceito e definições	19
1.2. Etiologia	20
1.2.1. Agentes ambientais	20
1.2.2. Aspectos genéticos	22
1.2.3. Mecanismo molecular	25
1.3. Justificativa e relevância	31
1.4. Objetivos	32
1.4.1. Objetivo Geral	32
1.4.2. Objetivos Específicos	32
2.1. Aspectos Éticos	33
2.2. Delineamento do estudo	33
2.3 Participantes	34
2.3.1. Critérios de inclusão	34
2.3.2. Critérios de exclusão	34
2.3.3. Seleção da amostra	34
2.4.1. Avaliação morfológica	37
2.4.2. Avaliação genético-molecular	37
2.4.2.1. Coleta das amostras biológicas	37
2.4.3. Cariótipo com bandamento G	39
2.4.3.1. Preparo da amostra para cariótipo	39
2.4.3.2. Cultura de células	39
2.4.3.3. Preparação citológica	39
2.4.3.4. Confecção de lâminas	40
2.4.3.5. Coloração das lâminas	40
2.4.3.6. Análise citogenética	40
2.4.4. Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction- PCR) para o gene fragile X mental retardation 1 ( <i>FMRI</i> )	41

2.4.4.1. Preparo das amostras	41
2.4.4.2. PCR para o gene <i>FMR1</i>	41
2.4.4.2.1. Cálculo para a determinação do número de repetições CGG	42
2.4.4.3. Kit AmplideX® PCR/CE <i>FMR1</i>	42
2.4.4.3.1. Cálculo para a determinação do número de repetições CGG no Kit AmplideX® PCR/CE <i>FMR1</i>	43
2.4.5. Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA)	43
2.4.5.1. Princípio do Método e Modificações no protocolo	43
2.4.5.2. Preparo das Amostras	44
2.4.5.3. Análise dos Resultados da MLPA	44
2.5. Análises estatísticas	45
3. Resultados	47
3.2. Dados Clínicos e Demográficos	47
3.2.1. Descrição das crianças e adolescentes	47
3.2.2. Descrição materna	50
3.3. Avaliação genético-molecular	52
3.3.1. Avaliação Morfológica	52
3.3.2. Resultados dos Testes Genéticos	57
3.3.2.1. Cariótipo com bandamento G	57
3.3.2.2. PCR para o gene <i>FMR1</i>	59
3.3.2.3. MLPA	63
4. Discussão	78
5. Conclusões	87
6. Referências Eletrônicas e Bibliográficas	88
7. Anexo	102
<b>ANEXO I</b> - Parecer nº 2.132.120	102
<b>ANEXO II</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	108
<b>ANEXO III</b> - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE	112
<b>ANEXO IV</b> - Protocolo para Cadastro	116
<b>ANEXO V</b> - Protocolo de Extração de DNA Modificado	118
<b>ANEXO VI</b> - Protocolo com as concentrações e quantidades da PCR modificado de Zhou et al., (2004,2006)	119
<b>ANEXO VII</b> - Protocolo para reação de PCR para o kit AmplideX® PCR/CE <i>FMR1</i>	121
<b>ANEXO VIII</b> - Protocolo para reação dos kits de SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2	122
<b>ANEXO IX</b> - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P245-B1	126

<b>ANEXO X</b> - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P343-C2	130
<b>ANEXO XI</b> - Tabelas de dados clínicos da crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhadas no Ambulatório Borges da Costa	135

## RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por comprometimento da interação social e da comunicação, associado a comportamentos repetitivos e estereotípias. O TEA apresenta um amplo espectro de variação fenotípica, quando se considera grau de comprometimento e limitações impostas ao afetado e sua família. Além disto, comorbidades são frequentes, como epilepsia, distúrbios de fala e linguagem e deficiência intelectual. Algumas formas se caracterizam por regressão comportamental. A condição é multifatorial, com diversas causas já identificadas, como exposição à poluentes, infecções na gestação, doenças maternas. Causas genéticas são identificadas em uma fração dos pacientes, incluindo alterações cromossômicas (trissomias e translocações), alterações submicroscópicas (microdeleções e microduplicações) e distúrbios monogênicos (síndrome do X Frágil, entre muitos outros). Ao longo das últimas décadas, a frequência de TEA tem aumentado, atingido 1 a 2% em diversas populações. Este aumento de frequência tem justificado diversos estudos sistemáticos, buscando caracterizar a contribuição dos diversos tipos de etiologias em diferentes populações. A pesquisa e a identificação de anomalias genéticas podem contribuir para uma melhoria no fluxo de diagnóstico e potencialmente influenciar abordagens terapêuticas. Nenhum estudo semelhante foi conduzido na população do estado de Minas Gerais. O objetivo deste estudo foi investigar a contribuição de alguns distúrbios genéticos para a etiologia do TEA em uma amostra de pacientes de um serviço de psiquiatria infantil em acompanhamento regular em hospital terciário de Minas Gerais. Trata-se portanto de estudo transversal com amostra de conveniência. O diagnóstico de TEA foi realizado por psiquiatria infantil com base em critérios clínicos do DSM-IV/V e CID-10. Dados clínicos e demográficos foram obtidos através de pesquisa do prontuário e entrevistas estruturadas com os pais ou responsáveis. Os testes genéticos foram realizados de forma escalonada na seguinte ordem: cariótipo, triagem para mutações expansivas em FMR1 (Síndrome do X frágil) e detecção de microdeleções e microduplicações específicas usando-se os kits SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2. No cariótipo com bandamento G foram analisadas no mínimo 20 células, na resolução de 400 a 450 bandas. A pesquisa molecular da Síndrome de X frágil foi baseada na determinação do número de repetições CGG no gene *FMRI*. Na pesquisa de deleções e duplicações, foram usados os kits SALSA MLPA P245-B1, para triagem de síndromes genéticas que podem estar associadas ao TEA, e o kit de SALSA MLPA P343-C2, para avaliar regiões cromossômicas relacionadas especificamente ao TEA. Foram analisadas 65 amostras de crianças e adolescentes de 2 a 17 anos (idade média  $10\pm 3,21$  anos), sendo 80% do sexo masculino. A idade gestacional média foi  $38\pm 2,86$  semanas, sendo 13,8% prematuros e 10,9% com baixo peso ao nascimento. Outros achados clínicos mais frequentes foram história de sofrimento fetal, icterícia neonatal e epilepsia. A idade média materna ao nascimento foi de  $29\pm 8,62$  anos. Pré-eclâmpsia foi relatada na gestação de nove pacientes (13,8%) e diabetes gestacional em três. A frequência de pré-eclâmpsia em nossa amostra foi maior do que a da população geral, condição já associada a risco aumentado de autismo. Dismorfismo, detectados por análise de fotografias, estiveram presentes em 25 (40%) de 62 pacientes. Não foram detectadas alterações numéricas e estruturais ao cariótipo. Um (1,5%) de 65 pacientes apresentou Síndrome do X frágil. Dois pacientes tiveram diagnóstico molecular estabelecido com o kit SALSA MLPA P245-B1, uma deleção em 15q24, presente em uma paciente do sexo masculino, e uma outra deleção em 22q13, presente em um paciente do sexo feminino. Esta última

alteração foi também detectada pelo kit SALSA MLPA P343-C2. Além disso, foram dois resultados duvidosos foram obtidos com o kit SALSA MLPA P245-B1, que vão requerer investigações subsequentes. Desta forma, a taxa de detecção global com os testes genéticos usados aqui foi de 3:49, 6,1% (IC-95%, 2,1-17%). A frequência de diagnóstico molecular estabelecidos com esta abordagem reforça a necessidade de se investigar diagnóstico etiológico em pacientes com TEA. Os métodos usados permitem avaliar apenas regiões específicas do genoma. Este estudo de ser continuado e complementado com métodos mais abrangentes, como aCGH e exoma.

Palavra Chaves: Autismo, TEA, Transtorno do espectro autista, *FMRI*, alterações cromossômicas, MLPA

## ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairment of social interaction and communication associated with repetitive behaviors and stereotypies. The TEA presents a broad spectrum of phenotypic variation when considering the degree of commitment and limitations imposed on the affected person and his / her family. In addition, comorbidities are frequent, such as epilepsy, speech and language disorders, and intellectual disability. Some forms are characterized by behavioral regression. The condition is multifactorial, with several causes already identified, such as exposure to pollutants, infections during pregnancy, maternal diseases. Genetic causes are identified in a fraction of the patients, including chromosomal changes (trisomy and translocations), submicroscopic alterations (microdeletions and microduplications) and monogenic disorders (Fragile X syndrome, among many others). Over the last decades, the frequency of TEA has increased, reaching 1 to 2% in several populations. This increase in frequency has justified several systematic studies, seeking to characterize the contribution of different types of etiologies in different populations. Research and identification of genetic abnormalities may contribute to an improved flow of diagnosis and potentially influence therapeutic approaches. No similar study was conducted in the population of the state of Minas Gerais. The objective of this study was to investigate the contribution of some genetic disorders to the etiology of ASD in a sample of patients from a child psychiatry service under regular monitoring in a tertiary hospital in Minas Gerais. It is therefore a cross-sectional study with a convenience sample. The diagnosis of ASD was performed by a child psychiatrist based on clinical criteria of DSM-IV/V and ICD-10. Clinical and demographic data were obtained through medical record research and structured interviews with parents or guardians. The genetic tests were performed staggered in the following order: karyotype, screening for expansive mutations in FMR1 (Fragile X Syndrome) and detection of microdeletions and specific microduplications using the SALSA MLPA P245-B1 and SALSA MLPA P343-C2 kits. In the karyotype with G-bandage, at least 20 cells were analyzed in the resolution of 400 to 450 bands. Molecular research on Fragile X Syndrome was based on the determination of the number of CGG repeats in the FMR1 gene. In the study of deletions and duplications, the SALSA MLPA P245-B1 kits were used to screen for genetic syndromes that may be associated with TEA and the MLPA P343-C2 SALSA kit to evaluate specific TEA-related chromosomal regions. We analyzed 65 samples of children and adolescents aged 2 to 17 years (mean age  $10 \pm 3.21$  years), being 80% male. The mean gestational age was  $38 \pm 2.86$  weeks, being 13.8% preterm and 10.9% with low birth weight. Other more frequent clinical findings were history of fetal distress, neonatal jaundice and epilepsy. The mean maternal age at birth was  $29 \pm 8.62$  years. Pre-eclampsia was reported in gestation of nine patients (13.8%) and gestational diabetes in three. The frequency of preeclampsia in our sample was greater than that of the general population, a condition already associated with an increased risk of autism. Dysmorphism, detected by analysis of photographs, were present in 25 (40%) of 62 patients. No numerical and structural changes were detected to the karyotype. One (1.5%) of 65 patients had Fragile X Syndrome. Two patients had a molecular diagnosis established with the SALSA MLPA P245-B1 kit, a 15q24 deletion present in one male patient, and another 22q13 deletion present in a female patient. This latter change was also detected by the SALSA MLPA P343-C2 kit. In addition, two questionable results were obtained with the

SALSA MLPA P245-B1 kit, which will require subsequent investigations. Thus, the overall detection rate with the genetic tests used here was 3:49, 6.1% (IC-95%, 2.1-17%). The frequency of molecular diagnosis established with this approach reinforces the need to investigate etiologic diagnosis in patients with ASD. The methods used allow only specific regions of the genome to be evaluated. This study will be continued and complemented with more comprehensive methods such as aCGH and exoma.

**Key Words:** Autism, TEA, Autistic Spectrum Disorder, FMR1, chromosomal abnormalities, MLPA

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA

ADDM	<i>Autism and Developmental Disabilities Monitoring</i>
AFM	Anomalias Físicas Menores
APA	Associação Psiquiátrica Americana
ASI	<i>Applied Spectral Imaging</i>
CGH	Hibridização Genômica Comparativa
CGH Array	Arranjo de hibridização genômica comparada
CHRNA7	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 7 Subunit</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
COEP-UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GABA	Ácido gama-aminobutírico
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
LCR	<i>Low Copy Repeat</i>
mL	Mililitro
mTP-PCR	PCR triplete sensível a metilação
NAHR	Recombinação homóloga não alélica
NHEJ	União de extremidades não homólogas
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NTO/IHP	Núcleo Técnico Operacional do Instituto Hermes Pardini
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPMI-1640®	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RPM	Rotação por minuto
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNP-Array	Arranjo de polimorfismo de nucleotídeo único

SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TID-SOE	Transtorno invasivo de desenvolvimento - sem outras especificações
TH1	Linfócitos T auxiliar 1
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo I** - Parecer nº 2.132.120

**Anexo II** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

**Anexo III** - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE

**Anexo IV** - Protocolo para Cadastro

**Anexo V** - Protocolo de Extração de DNA Modificado

**Anexo VI** - Protocolo com as concentrações e quantidades da PCR modificado de Zhou et al., (2004,2006)

**Anexo VII** - Protocolo para reação de PCR para o kit AmplideX® PCR/CE FMR1

**Anexo VIII** - Protocolo para reação dos kits de SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2

**Anexo IX** - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P245-B1

**Anexo X** - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P343-C2

**Anexo XI** - Tabelas de dados clínicos da crianças e adolescentes

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fluxograma de seleção dos pacientes com TEA do Ambulatório de Autismo durante o estudo

**Figura 2:** Fluxograma de Atendimento para as Avaliações

**Figura 3:** Cariograma paciente do sexo masculino- HBC 26.1

**Figura 4:** Cariograma paciente do sexo masculino- HBC 38.1

**Figura 5:** Eletroferograma do paciente HBC 65.1 método de Zhou et al., 2004;2006 para o gene *FMR1* e AmplideX® PCR/CE FMR1

**Figura 6:** A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA da paciente HBC 25.1 com a posição cromossômica das sondas

**Figura 7:** A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 13.1 com a posição cromossômica das sondas

**Figura 8:** A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 12.1 e HBC 20.1 com a posição cromossômica das sondas

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Regiões genômicas descritas com maior frequência de alteração no TEA

**Tabela 2.** Dados demográficos e clínicos das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

**Tabela 3.** Dados demográficos e clínicos das mães das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

**Tabela 4.** Descrição dos distúrbios leves observados nas crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

**Tabela 5.** Descrição dos distúrbios relevantes observados nas crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

**Tabela 6.** Comparação entre os resultados da estimativa do tamanho da repetição CGG à 5' do gene FMR1, conforme as técnicas de Zhou et al, 2004,2006 e o kit AmplideX® PCR/CE FMR1

**Tabela 7.** Resultados dos testes genéticos das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

## 1. Introdução

### 1.1 Transtorno do Espectro Autista: conceito e definições

Ao longo das últimas décadas, vem se observando uma aumento global na frequência de autismo. Nos Estados Unidos da América (EUA), um estudo recente da base populacional americana, cobrindo uma amostra de mais de 43.283 crianças entre 3 e 17 anos, indicou uma frequência de diagnóstico de autismo de 2,5% (KOGAN et al., 2018). Os estudos de prevalência publicados no período de 1966 a 2016 no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) identificou na Ásia, Europa e América do Norte uma prevalência média entre 1% e 2% de indivíduos com TEA (Transtorno do Espectro Autista). A rede de monitoramento *Autism and Developmental Disabilities Monitoring* (ADDM) nos Estados Unidos da América estimou a prevalência do autismo em 13,1 a 29,3 por 1.000 crianças de 8 anos em 11 estados americanos, em uma amostra de 325.483 crianças no período de 2000 a 2014 (BAIO et al., 2018). Nos países desenvolvidos, o relato já atinge cerca de 1% a 1,5% das crianças com autismo (ZWAIGENBAUM et al., 2018; ZABLOTSKY et al., 2015; LICHTENSTEIN et al., 2010; GESCHWIND, 2009). Meninos são quatro vezes mais afetados do que meninas e todos os grupos étnicos ou socioeconômicos são similarmente afetados.

Classificado como um dos transtornos do neurodesenvolvimento, o TEA possui características essenciais e persistentes, que prejudicam três domínios comportamentais; comunicação, comprometimento da interação social e comportamento restritos e repetitivos antes do três anos (DSM-V, 2014). As manifestações do TEA variam muito dependendo da gravidade, gênero, do nível de desenvolvimento e a idade cronológica; consequentemente, o uso do termo espectro é mais adequado (DSM-V, 2014).

Os critérios comportamentais são indicados pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), utilizado como padrão para diagnóstico de autismo nos EUA. No Brasil, a avaliação diagnóstica baseia-se nos critérios estabelecidos pela Classificação Internacional de Doenças - (CID-10) e também pelo Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais - (DSM-V). No diagnóstico do TEA deve-se utilizar os Critérios A, B, C, D e E do DSM-

V e especificar a gravidade baseada no prejuízo da comunicação e comportamento e estimar as demandas assistenciais do indivíduo e sua família.

O aumento da prevalência do TEA nos leva a pensar sobre sua heterogeneidade. Desta forma, não possuindo apenas um agente causador único, as origens epigenéticas, genéticas e ambientais são pontos principais para sua investigação. Estes agentes influenciam diretamente a expressão das redes neuronais, conectividade córtico-subcorticais, interneurônios gabaérgicos, neurotransmissores e a função celular (LINTAS, 2019).

A etiologia exata do TEA ainda permanece desconhecida e os estudos demonstraram que tanto fatores genéticos quanto ambientais estão associados (MOESCHLER, 2019; SGRITTA et al., 2019). O TEA é apresentado na literatura como um distúrbio multifatorial. No nível individual, entretanto, podem haver causas específicas, tanto ambientais quanto genéticas. É importante lembrar que os agentes ambientais vão causar o TEA em indivíduos geneticamente suscetíveis.

## 1.2. Etiologia

### 1.2.1. Agentes ambientais

No período pré-natal, os fetos são mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos, especialmente relacionados a uma barreira hematoencefálica imatura e processos neuronais em desenvolvimento, como migração e mielinização de células nervosas que ocorrem em uma ordem específica. Algumas substâncias tóxicas como poluentes orgânicos persistentes, bifenilpoliclorados, pesticidas organoclorados, éteres difenílicos polibromados, dioxinas, substâncias perfluoroalquílicas e bisfenol A, podem atravessar a placenta e acessar facilmente o sistema nervoso fetal, interferindo nestes processos vitais, e possivelmente, levando a desfechos adversos (LONG et al., 2019).

Vários processos biológicos estão envolvidos na etiopatogenia dos indivíduos com TEA e os diferentes níveis de expressão gênica entre diferentes tipos de tecidos biológicos corroboram estes achados (KAMEN et al., 2019). No estudo de Ansel e colaboradores (2017), foi observada diferença na expressão de proteínas relacionadas com

neurodesenvolvimento, sinapse nas células do cérebro e linfócitos de linhagens diferentes, além de interações com sistema imune e gastrointestinal em indivíduos afetados.

Além disto, as infecções materno-fetais, como rubéola, toxoplasmose, citomegalovírus e zika vírus, que podem interferir no desenvolvimento cerebral, estando associadas à presença de lesões, como calcificações cerebrais, microcefalia e à alterações funcionais como o TEA (VIANNA et al., 2019). Durante fases específicas do período gestacional, evidências clínicas sugerem que as infecções podem interferir no ambiente intrauterino e se associarem ao maior risco da criança desenvolver o autismo (LEE et al., 2015). A influência destes fatores relaciona-se às fases de desenvolvimento neurológico e do desenvolvimento do sistema imune, que se influenciam mutuamente. Como exemplo de indícios de infecção, foi observado que durante desenvolvimento do feto há um influxo da resposta dos linfócitos T auxiliar 1 (TH1), que ajuda na resposta pró-inflamatória (SEALEY et al., 2016).

Exposição a certos medicamentos como ácido valpróico no período pré e pós-natal também pode alterar o desenvolvimento do cérebro e resultar em anormalidades comportamentais e déficits cognitivos (TARTAGLIONE et al., 2019). No TEA o risco pode atingir 4,42% (MEADOR et al., 2019). Estudos experimentais sugerem duas vias de impacto farmacológico nas crianças expostas ao ácido valpróico: um efeito é a redução da excitabilidade de circuitos neurais por inibir a recaptção sináptica de ácido gama-aminobutírico (GABA) e o outro é a regulação epigenética da remodelação cromossômica por inibição da atividade das histonas deacetilase (KUO; LIU, 2018).

Outros fatores maternos têm sido sugeridos na literatura, como a síndrome metabólica materna, e fatores nutricionais como a deficiência materna de vitaminas, como vitamina D, ou suplementação de ácido fólico podem estar associados ao aumento do risco de autismo (NEGGERS, 2014).

A metilação do DNA, mecanismo epigenético, pode ser influenciada por fatores ambientais, como: dieta, hormônios, estresse, drogas ou exposição a produtos químicos ambientais, sugerindo que fatores ambientais podem causar efeitos na estrutura química

do DNA, afetando o cérebro em desenvolvimento (TREMBLAY, et al., 2019). Desta forma, exposições químicas são mais prontamente controladas do que fatores genéticos para prevenir ou mitigar traços deletérios relacionados à doença do neurodesenvolvimento e ressaltam a relevância e o impacto potencialmente significativo da investigação dos mecanismos epigenéticos induzidas pelo ambiente.

### 1.2.2. Aspectos genéticos

A origem genética do TEA ainda é desconhecida, todavia estudos realizados apontam para a existência de um forte componente genético influenciado por um mecanismo multifatorial, ou seja, alterações genéticas associadas à presença de fatores ambientais atuando na determinação da doença (GUPTA et al., 2006). Sendo assim, pode-se hipotetizar que fatores causais primários (causas monogênicas, fatores epigenéticos e ambientais ou outros fatores causais ainda não identificados) não resultam diretamente em comprometimento cognitivo (SRIVASTAVA et al., 2014).

Estudos de gêmeos tem permitido estimar uma herdabilidade bastante alta no TEA. Em um estudo de coorte populacional, estimada a herdabilidade do TEA em 0,83 (IC 95%, 0,79-0,87) e a influência ambiental não compartilhada foi estimada em 0,17 (IC 95%, 0,13-0,21). O modelo incluiu parâmetros genéticos aditivos e não aditivos genéticos, compartilhados e não-compartilhados foi escolhido como o modelo completo sob o qual submodelos aninhados foram testados. No modelo completo, a variância do ambiente compartilhado foi estimada em 0,04 (IC 95%, 0,00-0,14); ambiente não compartilhado, 0,16 (IC 95%, 0,05-0,30); genética não aditiva, 0,1 (95% CI, 0,00-0,38); e genética aditiva (herdabilidade), 0,69 (IC 95%, 0,40-0,86). Usando apenas gêmeos, a herdabilidade foi estimada em 0,87 (IC 95%, 0,68-0,96) (SANDIN et al., 2017)

Estudos de família, da Universidade da Califórnia, em Los Angeles, na Universidade de Utah, nos EUA, relataram riscos significativos de recorrência de irmãos em famílias grandes de Utah, EUA; o risco de recorrência de irmãos foi de 8,6% e para famílias com duas ou mais crianças afetadas, o risco de recorrência aproximou-se de 35% (MILES, 2011).

Já estudos epidemiológicos de concordância de TEA em gêmeos do mesmo sexo favorecem uma explicação predominantemente genética, com herdabilidade de pelo menos 90% sob um modelo multifatorial (BAILEY et al., 1995). As taxas de concordância para gêmeos monozigóticos são significativamente superiores aos dos gêmeos dizigóticos, Smalley e colaboradores (1988) relataram uma concordância média para gêmeos monozigóticos de 64% contra 9% para gêmeos dizigóticos. Por outro lado, um estudo de gêmeos estimou a herdabilidade de 37% para o autismo sintomático e valores similar para o autismo não sintomático, embora com um amplo intervalo de confiança (IC) (8% a 84%) e um componente de variância ambiental compartilhada de 55% (IC 95%, 9% a 81%) (HALLMAYER et al., 2011).

Ainda temos a prevalência relativamente baixa na população de TEA e a frequência relativamente alta de alterações de DNA *de novo*, que podem afetar o risco, tornando a interpretação desses estudos com gêmeos mais complexo. Sendo assim, o grau substancial de agregação familiar no TEA pode ser devido à genética, ou a fatores genéticos e ambientais compartilhados, mas não pode ser explicado predominantemente por fatores ambientais (DEVLIN et al., 2012).

Em uma abordagem meta-analítica quantitativa foi estimada a herdabilidade do TEA usando estudos de gêmeos entre 0,64 e 0,91 (TICK et al., 2016). Entretanto, é difícil imaginar um mecanismo puramente genético, que possa explicar o aumento de frequência do TEA. Desta forma, estes achados de alta herdabilidade sugerem a existência de fatores ambientais agindo sobre indivíduos geneticamente suscetíveis.

Evidências para fatores genéticos vêm do aumento da frequência de TEA em doenças genéticas específicas ou da identificação de alterações em amostras de pacientes com TEA, seja por triagem de mutações em genes específicos, aCGH ou exoma. O autismo é tipicamente classificado em formas sintomáticas e não-sintomáticas. Indivíduos portadores mutações de gene único, variações no número de cópias e / ou anormalidades cromossômicas, além de um diagnóstico de autismo são geralmente classificados como "sintomáticos". O autismo não sintomático é caracterizado por indivíduos com diagnóstico primário de autismo e não apresenta mutação associada a uma variante genética bem conhecida (ADHYA et al., 2019).

O autismo não síndrômico é diagnosticado em aproximadamente 75% dos pacientes com TEA. Recorrência familiar tem sido descrita em cerca de 20% dos casos, sendo mais alta em irmãos, cerca de 35%. Comparativamente, o TEA síndrômico ocorre em aproximadamente 25% dos pacientes. Nestes indivíduos, características autistas ocorrem em conjunto com dismorfias ou malformações congênitas. Além disso, o risco de recorrência para os irmãos é menor (4% a 6%) do que no autismo não síndrômico e a história familiar é menos frequente (9%) (WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK et al., 2019).

O conceito de espectro reflete tanto a diversidade entre os indivíduos quanto à gravidade dos sintomas, e portanto o reconhecimento da sobreposição entre uma coleção de desordens clinicamente descritas é importante (SCHERER & DAWSON, 2011).

O TEA pode se associar à deficiência intelectual e dificuldades de coordenação motora. Além dos sintomas nucleares, mais de 60% dos indivíduos afetados pode apresentar outras comorbidades, tais como epilepsia (30%), problemas gastrointestinais (9-70%), déficit de atenção e hiperatividade (30%) e distúrbios do sono (50%). Na adolescência, podem desenvolver sintomas de ansiedade e depressão (MOREIRA, 2014; LEBLOND et al., 2019).

Anomalias Físicas Menores (AFM) são as anormalidades da cabeça, face e membros, sem impacto significativo na função mecânica do indivíduo. Aparecem na literatura descritas como dismorfias ou dismorfismos. Presume-se que representem marcadores externos de desvios do desenvolvimento durante a vida pré-natal. São anormalidades morfológicas sutis da face e membros, particularmente mãos e pés. Em função das interações do desenvolvimento de face e sistema nervoso central, considera-se que dismorfias faciais reflitam alterações do desenvolvimento do cérebro. Frequências mais altas de AFM foram descritas em crianças com autismo (MANOUILENKO et al., 2014).

Um grande progresso na identificação das causas genéticas veio com o emprego de métodos de detecção de mutações em escala genômica, como o aCGH e o exoma.

Usando técnicas moleculares adequadas, uma causa genética pode ser identificada em 25-35% das crianças com TEA (WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK et al., 2019). Este número aumentou com o uso do *array*, uma estrutura de armazenamento de dados genômicos; atualmente temos os microarranjos: (*CGH Array* – para variação no número de cópias e *SNP-Array* – para polimorfismo de nucleotídeo único) que consistem em estudos de hibridização genômica comparativa para regiões específicas do DNA ou para uma única base nitrogenada. As alterações genéticas já identificadas no autismo podem ser classificadas como: anormalidades cromossômicas citogenéticas (presentes em cerca de 5% dos casos), deleções e duplicações nas CNVs (*copy number variation*) das regiões submicroscópicas entre (10%-20%), e desordens de gene único (5%).

### 1.2.3. Mecanismo molecular

As CNVs são segmentos de DNA de 1 kb ou maior, presentes em um número de cópias variável em comparação com um genoma de referência. Classes de CNVs incluem inserções, deleções e duplicações. Esta definição também inclui variantes de número de cópias em grande escala com segmentos de DNA  $\geq 50$  kb. Estes segmentos de DNA com regiões repetitivas são mais propícios a rearranjos. Tais rearranjos ocorrem via mecanismos de recombinação enquanto mutações pontuais de menores tamanho resultam de erros de replicação ou reparo de DNA (FEUK et al., 2006). Pontos de interrupção de rearranjo cromossômico foram localizados em todo o genoma; no entanto, eles predominam nas regiões pericentromérica e subtelomérica, particularmente em intervalos contendo arquitetura genômica complexa, como duplicações segmentares de cópia baixa repetições *Low Copy Repeat* (LCR) ou palíndromos ricos em Adenina-Timina. A recombinação homóloga não alélica (NAHR) é geralmente o mecanismo responsável por rearranjos com regiões de quebras em LCRs. E outros mecanismos como as (NHEJ) união de extremidades não homólogas, foram observados, particularmente para rearranjos com pontos de quebra dispersos (SHAW et al., 2004). Isso sugere que rearranjos cromossômicos não são eventos aleatórios, mas resultam da predisposição para rearranjo devido à existência de uma arquitetura genômica complexa que pode criar instabilidade no genoma.

Alterações nas CNVs foram descritas em poucas famílias de autistas, e embora nenhuma pareça ser particularmente comum, elas destacaram o potencial das técnicas

baseadas em *array* que auxiliam à direção para pesquisa de genes específicos dentro destas regiões. Como exemplo, a haploinsuficiência do gene *CHRNA7* (*Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 7 Subunit*), que pode ser causativo para a maioria dos fenótipos neurodesenvolvimental identificado na Síndrome de Microdeleção 15q13.3 (BEN, 2009), e na extremidade distal da região 15q11.2-q13 nas Síndromes Prader-Willi e Angelman (MCINNES, 2010). Entretanto, também foram observados em pacientes com um espectro de outros fenótipos neurocognitivos, incluindo deficiência cognitiva, convulsões, TDAH (transtorno do déficit de atenção com hiperatividade), dislexia, esquizofrenia, transtorno bipolar que foram descritos com a mesma associação (GIRIRAJAN, 2010). Estas associações de muitas doenças com a mesma alteração genética sugerem que CNVs específicas podem predispor a uma variedade de distúrbios neuropsiquiátricos, porém a causa final ainda está em elucidação.

Triagem de CNVs no genoma em populações em todo mundo vem apresentando suas frequências de acordo com os antecedentes étnicos, permitindo a distinção de populações de ascendências europeia, africana e asiática (JAKOBSSON, 2008). Podem ser classificadas em patogênicas, provavelmente patogênica, significado incerto, provavelmente benigna ou benigna (ELLARD et al., 2017). Mais de 100 alterações genômicas patogênicas diferentes têm sido relatadas em indivíduos com TEA (BETANCUR, 2011).

Existem limitações significativas na compreensão destes achados, o que pode ser devido aos diversos mecanismos genéticos envolvidos: penetrância e expressividade variável, herança multigênica, alterações herdadas não equilibradas, mutações que ocorrem *de novo*, microdeleção associadas a um dismorfismo, deleções e duplicações com consequências fenotípicas diferentes (DEVLIN et al., 2012).

Segundo Devlin & Scherer (2012), a etiologia genética do TEA pode ser identificada em 20-25% dos casos e podem ser consideradas quatro categorias:

- 1) rearranjos cromossômicos visíveis pela citogenética clássica, detectados em até 5% dos casos, como duplicações maternas de 15q11-q13, trissomia do cromossomo 21 (47, XX/XY, +21), síndrome de Turner (45, X) e síndrome de Klinefelter (47, XXY);

Na literatura contém relatos de inúmeras alterações citogenéticas relacionadas com TEA. As mais comumente anomalias citogenéticas encontradas em pessoas com TEA são deleções envolvendo os cromossomos 7q, 22q13, 2q37, 18q, e Xp e aneuploidias no cromossomo sexual (mosaicismo 47, XYY e 45, X/46, XY) (SCHAEFER et al., 2008;2013).

2) síndromes associadas, que contribuem com aproximadamente 10% dos casos, como as Síndromes: X Frágil (FXS), Esclerose Tuberosa (TSC), Fenilcetonúria, Rett (RTT), Timothy, Potocki-Lupski e Phelan–McDermid (PMS);

A incidência da Síndrome do X frágil no TEA atinge cerca 0-8% dos indivíduos (ZHANG ET AL., 2019). Ela é causada pelo decréscimo ou ausência da proteína FMR1 em mais de 99% dos casos (VERKERK et al.,1991). A base molecular desta doença é muito diferente das mutações típicas observadas em outras desordens de etiologia genética. O principal evento mutacional responsável pela Síndrome do X-frágil é a expansão do número de cópias do trinucleotídeo citosina-guanina-guanina (CGG) que se encontram repetidas na região não traduzida 5' (UTR) do gene *FMRI* (*fragile X mental retardation 1*) (VERKERK Et al., 1991). Raros os casos em que a doença é decorrente da deleção total ou parcial do gene *FMRI* (GEDEON et al., 1995; TARLETON, 2002;). O número de cópias do trinucleotídeo CGG no gene *FMRI* é polimórfico na população e varia de 6 a 54 repetições (FU et al., 1991). Indivíduos que apresentam repetições CGG entre 55-200 unidades são chamados de portadores de pré-mutação. Neste caso, são homens que desenvolvem tremor e ou ataxia e as mulheres transmissoras com insuficiência ovariana primária, mas expressam níveis normais da proteína FMRP e não apresentam a Síndrome do X-frágil (LOESCH et al., 1994). Indivíduos afetados apresentam acima de 200 repetições do trinucleotídeo, sendo chamados de portadores da mutação completa (OBERLE et al., 1991).

Existem características clínicas bem definidas entre o homens e mulheres, e principalmente em homens com um grande expansão na Síndrome do X-frágil. Em mulheres a metilação preferencial do cromossomo X, exibe um padrão de herança com expressão variável. Assim, recomenda-se que qualquer criança que apresenta com habilidades intelectuais limítrofes, deficiência cognitiva ou um diagnóstico de autismo sem uma etiologia específico realizem testes moleculares para Síndrome do X-frágil.

Estima-se que 2% a 6% desses pacientes serão diagnosticadas com a mutação FMR1 (MOESCHLER, 2019).

A Esclerose Tuberosa é um distúrbio genético autossômico dominante caracterizado por tumores benignos no cérebro e alta penetrância no TEA. É causada por mutações nos genes *TSC1* ou *TSC2* produtores de hamartina e tuberina, respectivamente. O RTT é causado por mutações na proteína de ligação metil-CpG 2 no gene *MECP2*. A Síndrome de Timothy é causada por mutações no gene *CACNA1C*; é caracterizada por malformações cardíacas congênitas, arritmia cardíaca, sindactilia, sistema imunológico enfraquecido e morte prematura. Mutações no gene *SHANK3* levam à PMS, caracterizado por epilepsia, disfunção renal e cardíaca anomalias (SUDHA et al., 2019).

Dentre as evidências metabólicas, as enzimas responsáveis pelas vias de degradação, produção de energia, sistema de transporte e ao metabolismo intermediário catalíticos podem representar cerca de 1% até 5% dos casos de deficiência cognitiva (MICHELSON et al., 2011). O desequilíbrio dos aminoácidos de cadeia ramificada em relação aos outros aminoácidos foi observado em um estudo de Smith e colaboradores em 2018, que encontrou uma frequência de 16,7% na desregulação do metabolismo no grupo de 516 crianças com TEA. Em uma revisão de prontuários com cerca de 8.500 pacientes para pesquisa dos Erros Inatos do Metabolismo, somente um paciente apresentava um EIM e diagnóstico de TEA. Os autores sugerem que a triagem para EIM deva ser considerada em pacientes com TEA não sindrômico, embora não seja custo eficiente foi encontrado com distúrbio do ciclo da ureia, não sendo assim considerado pelos autores um teste com custo efetivo para o diagnóstico diferencial no TEA (CAMPISTOL, et al, 2016). Entretanto, é importante lembrar que TEA tem sido descrito como parte das manifestações fenotípicas de diversos EIM, inclusive alguns tratáveis, como a fenilcetonúria ou a frutosemia.

3) Alterações nas CNVs envolvendo as regiões cromossômicas 16p11.2, 7q11.23, 22q11.2, 1q21.1, 15q13.3, 17p12 e 3q37-38, foram observadas em cerca de 5% dos casos;

A presença de deleção ou duplicação nestas regiões cromossômicas foram observadas em estudos de associação genômicas. Essas mutações raras, principalmente

na forma de variações estruturais cromossômicas submicroscópicas, são agora conhecidas por responder por até 10% dos casos de autismo idiopático (WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK et al., 2019).

4) mutações penetrantes raras nos genes *PTCHD1/PTCHD1AS*, *NRXN1*, *SHANK1*, *SHANK2*, *SHANK3*, *NLGN3*, *NLGN4X*, *NRXN3*, *CNTNAP2* e *DPP6*, observadas em 5% dos casos.

Algumas das regiões mais frequentemente descritas são listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Regiões genômicas descritas com maior frequência de alteração no TEA

Região	Genes Ligados no Cromossomo	Citogenética	Microarray	Coordenadas Genômicas	Deleção/ Duplicação	Genes Candidatos na Região
1p 1q	1q41-42		1p36.13 1q21.1 1q41	1:762.978-17.148.920 1:145.0-146.4 Mb 1:214.500.000-236.600.000	dup dup del	<i>HYDIN</i> <i>MARK1</i>
2p 2q	2q	2p16 2q37	2p16.3 2q31.1 2q37	2:50.145.642-51.259.673 2:93.300.000-243.199.373 2:231.972.946-231.989.823	del del,dup del	<i>NRXN1</i> <i>SLC25A12</i> <i>HTR2B</i>
3q	3q25-27		3q24	3:142.984.063-143.567.372 3:148.900.000-187.900.000	del, dup	<i>SLC9A9</i>
5p			5p15.1	5: 9.623.122-9.624.122	del	
7q	7q22.31	7q	7q11.23 7q22.1 7q31.2 7q35-q36	7:72.200.000 (1.5 Mb) 7:98.000.000-107.400.000 7:116.312.458-116.438.439 7:145.813.452-148.118.089	dup del del,dup del	<i>RELN</i> <i>FOXP2,WNT2,MET</i> <i>EN2. CNTNAP2</i>
11q			11q13.3- q13.4	11:70.313.960-70.935.807	del	<i>SHANK2</i>
12q	12q14.2			12:63.100.000-65.100.000		
13q	13q		13q14.2- q14.1	13:47.300.000-47.300.000	del	<i>5-HTR2A</i>
15q11-13	15q11-13	15q11-13	15q11-13 15q13.3	15q11-13 15: 20.7-26.7 (Mb) 15:28.736.917-30.686.830	dup del	<i>UBE3A,</i> <i>SNRPN,CHRNA7</i> <i>CHRNA7</i>
16p	16p		16p11.2	16p11.2 16:29.5-30.1 (Mb)	del, dup	

			16p13.11	16:15.5-16.5(Mb)	del, dup	
17p			17p11.2	17:20.156.497–22.975.771	del,dup	
17q	17p11.2		17q11.2	17:24.000.000–31.800.000	del	<i>SLC6A4</i>
			17q21.3	17:38.100.000–50.200.000	del,dup	<i>ITGB3</i>
18q	18q21-23	18q	18q21.1	18:47.793.251–47.808.143	del	<i>TCF4, MBD1</i>
21p	21p13-q11			21:0–16.400.000		
22q		22q11–13	22q11.2	22:19.744.225 (1.5–3.0 Mb)	del	<i>CRKL, FGF8, TBX1</i>
			22q13.3	22:51.113.069–51.171.639	del	<i>SHANK3</i>
Xp	Xp22	Xp	Xp22.31	X:6.463.313–8.091.810	del,dup	<i>NLGN4</i>
Xq	Xq13		Xq13.1	X:70.364.680–70.391.050	del,dup	<i>NLGN3</i>
			Xq28	X:153.287.263–153.363.187	del	<i>MECP2</i>

Adaptado de SCHAEFER et al., 2013.

### 1.3. Justificativa e relevância

Estudos epidemiológicos apontam um crescente número de diagnósticos de crianças com TEA. Em 1966, o primeiro estudo epidemiológico apresentou uma frequência de autismo na Inglaterra de 4,5 casos a cada 10.000 crianças entre 8-10 anos (LOTTER, 1996). Outro estudo, realizado duas décadas depois, no Japão, mostrou frequência de 15 casos a cada 10.000 crianças (OHTAKI et al., 1992). A frequência foi estimada em 0,40% na Austrália (ICASIANO et al., 2004), 0,1% no Iraque (KAMER et al., 2004) e 0,80% na Suécia (NYGREN et al., 2012). Apesar de muitos estudos apresentarem prevalências para essa desordem, os dados são isolados, de países específicos. Não se tem estudos epidemiológicos do TEA no Brasil.

Uma vez que existe um componente genético e que portanto pode haver um risco de recorrência aumentado em determinadas famílias, o aumento na frequência do TEA

impõe uma demanda em termos de diagnóstico etiológico. A avaliação genética molecular tem como objetivo unificar os agentes causadores e auxiliar no diagnóstico definitivo, para facilitar a aquisição de serviços necessários para o paciente e sua família, e finalmente, ajudar na eliminação de testes de diagnóstico desnecessários. São poucos os estudos enfocando as bases genético-moleculares no Brasil. Uma vez que a população é tri-híbrida e a estrutura genética varia bastante entre as diferentes regiões, caracterizar o componente genético subjacente ao TEA em diferentes populações brasileiras.

Portanto, a pesquisa de alterações genética nesta amostra mineira pode auxiliar a identificar alterações associadas ao TEA mais frequentes em nossa população, contribuindo para o maior entendimento dos fatores genéticos associados.

#### 1.4. Objetivos

##### 1.4.1. Objetivo Geral

Identificar a frequência de alterações genéticas presentes em uma amostra mineira diagnosticada com TEA.

##### 1.4.2. Objetivos Específicos:

1. Distinguir os participantes com TEA em termos clínicos e genéticos;
2. Averiguar a frequência de alterações cromossômicas numéricas e estruturais detectáveis ao cariótipo;
3. Averiguar a frequência de mutações expansivas em FMR1;
4. Averiguar a frequência de CNVs detectáveis por amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA), usando-se os kits SALSA MLPA P343-C2 - AUTISM-1 e SALSA MLPA P245-B1;
5. Avaliar custo-efetividade do uso de *screening* inicial MLPA para a triagem de CNVs.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-MG) através do parecer nº 2.132.120 (Anexo I). A participação no estudo foi condicionada à leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo II) e ao Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE (Anexo III), CAAE: 67953817.6.0000.5149.

### 2.2. Delineamento do estudo

Trata-se de estudo transversal, com amostra de conveniência, realizado no Ambulatório de Autismo do Hospital Borges da Costa, no complexo do Hospital das Clínicas - UFMG, um centro público de atendimento psiquiátrico às crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro Autista (TEA) da região metropolitana de Belo Horizonte e do interior de Minas Gerais.

A pesquisa ocorreu no período de junho de 2017 a dezembro de 2018. A coleta das amostras biológicas ocorreu no período de julho de 2017 à novembro de 2018 no Laboratório Hermes Pardini, unidade Bernardo Monteiro, após adesão à pesquisa e entrevista para coleta de dados.

Os testes genético-moleculares foram realizados no Laboratório Hermes Pardini no Núcleo Técnico Operacional (NTO) em Vespasiano, Minas Gerais, no período de dezembro de 2017 a janeiro de 2019. Os testes genéticos realizados foram (ver detalhamento abaixo):

- Cariótipo com bandamento G, para uma resolução de 400-450 bandas
- PCR (reação em cadeia da polimerase) para o gene *FMR1*
- MLPA (amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação)

## 2.3 Participantes

Os participantes deste estudo foram 65 crianças e adolescentes com diagnóstico clínico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) em atendimento médico regular no Ambulatório de Autismo do Hospital Borges da Costa, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

O diagnóstico foi realizado por psiquiatra infantil segundo critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV/V) e Classificação Internacional de Doenças (CID-10). Foram incluídos crianças e adolescentes, na faixa etária de 2 a 17 anos, e de ambos os sexos.

Quando disponíveis, amostras dos pais foram coletadas e para eventuais confirmação das alterações genéticas.

### 2.3.1. Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de TEA.
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), quando possível

### 2.3.2. Critérios de exclusão

- Presença de alterações bioquímicas detectadas ao teste do pezinho;
- Presença de fatores associados à etiologia não genética (diagnóstico de infecção congênita, hipóxia neonatal grave ou uso de drogas teratogênicas na gravidez).

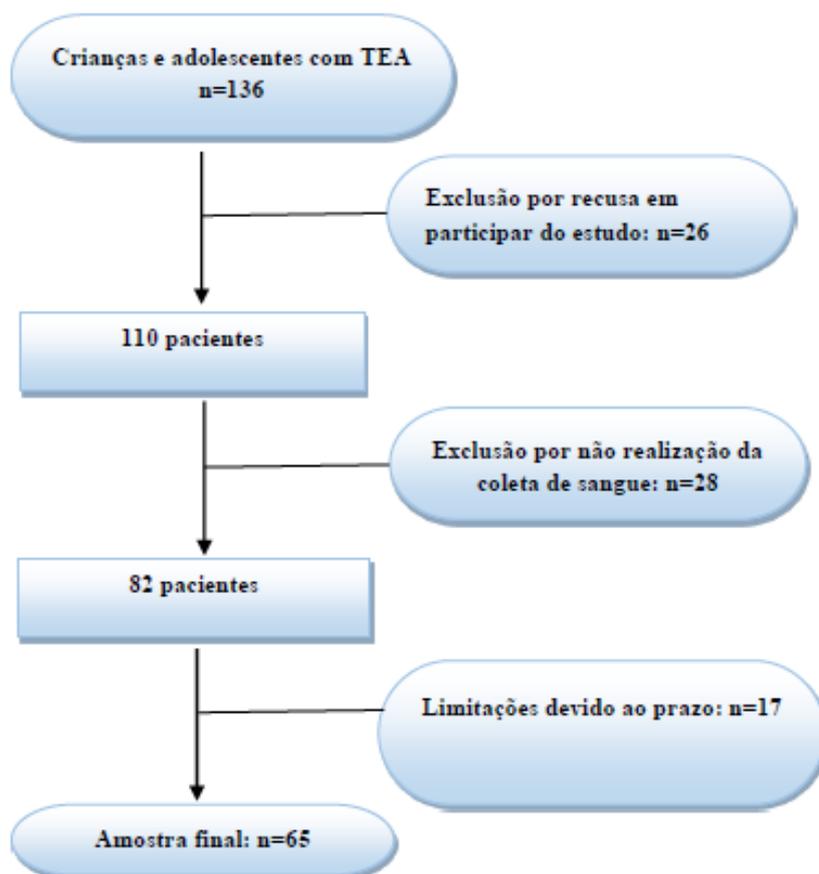
### 2.3.3. Seleção da amostra

Atualmente, encontram-se cadastrados no Ambulatório de Autismo 136 pacientes. A amostragem obtida no ambulatório foi condicionada a coleta de sangue venoso da criança/adolescente e, se possível, de seus genitores. A amostragem final foi composta por 65 pacientes, obtivemos 71 casos (48%) de recusa na participação da pesquisa. Dentre os motivos da recusa, em 28 (17%) houve dificuldade na imobilização da

criança/adolescente para coleta de sangue venoso, em 26 (15%) houve falta de interesse no diagnóstico por parte dos pais e nos restantes 17 (13%) houve limitações devido ao prazo do estudo (não estiveram no ambulatório ou foram admitidos posteriormente). No grupo exclusão por não realizar a coleta de sangue 28 (17%), conseguimos preencher o protocolo de cadastro e encontramos idade média de 9 ( $\pm 3,80$ ) anos. Este grupo também apresentou maior grau de agitação nas entrevistas. Nos demais casos não obtivmos informações.

A descrição dos casos incluídos e excluídos encontra-se esquematizada na Fig. 1.

Figura 1: Fluxograma de seleção dos pacientes com TEA do Ambulatório de Autismo durante o estudo



## 2.4. Coleta dos dados clínicos e demográficos

Os dados demográficos e clínicos foram coletados através de entrevista com os responsáveis e pesquisa dos prontuários. Foi utilizado formulário construído pelos autores (Protocolo para Cadastro) e estabelecido no início do estudo (Anexo IV).

### 2.4.1. Avaliação morfológica

As avaliações foram feitas por fotografia da frontal, perfil direito e esquerdo da face. Além disso, foram avaliadas fotografias das mãos, vista palmar e dorsal (ANGKUSTSIRI et al., 2012). As análises foram coletadas no Protocolo para Cadastro. Sendo assim, a avaliação morfológica dos pacientes consistiu em análise de fotos por um geneticista clínico (Dra. Anisse Chami e Dra. Maria Raquel Carvalho), o qual demonstrou uma impressão de quais pacientes apresentavam dismorfismos relevantes, que incluía fotos da face e das mãos. A impressão dos dismorfismos foi classificada em “dismorfismos relevantes”, “dismorfismos leves” e “ausência de dismorfismos relevantes”.

Nesta avaliação, observamos as seguintes características: forma craniana, implantação dos cabelos, formato da face e sobrancelhas, posição dos olhos, queda palpebral, características de face em geral, do nariz, das orelhas, da boca, mandíbula e pescoço. Nas mãos, observamos o formato dos dedos e a região palmar/pregas palmares. Não dispomos de dados antropométricos detalhados.

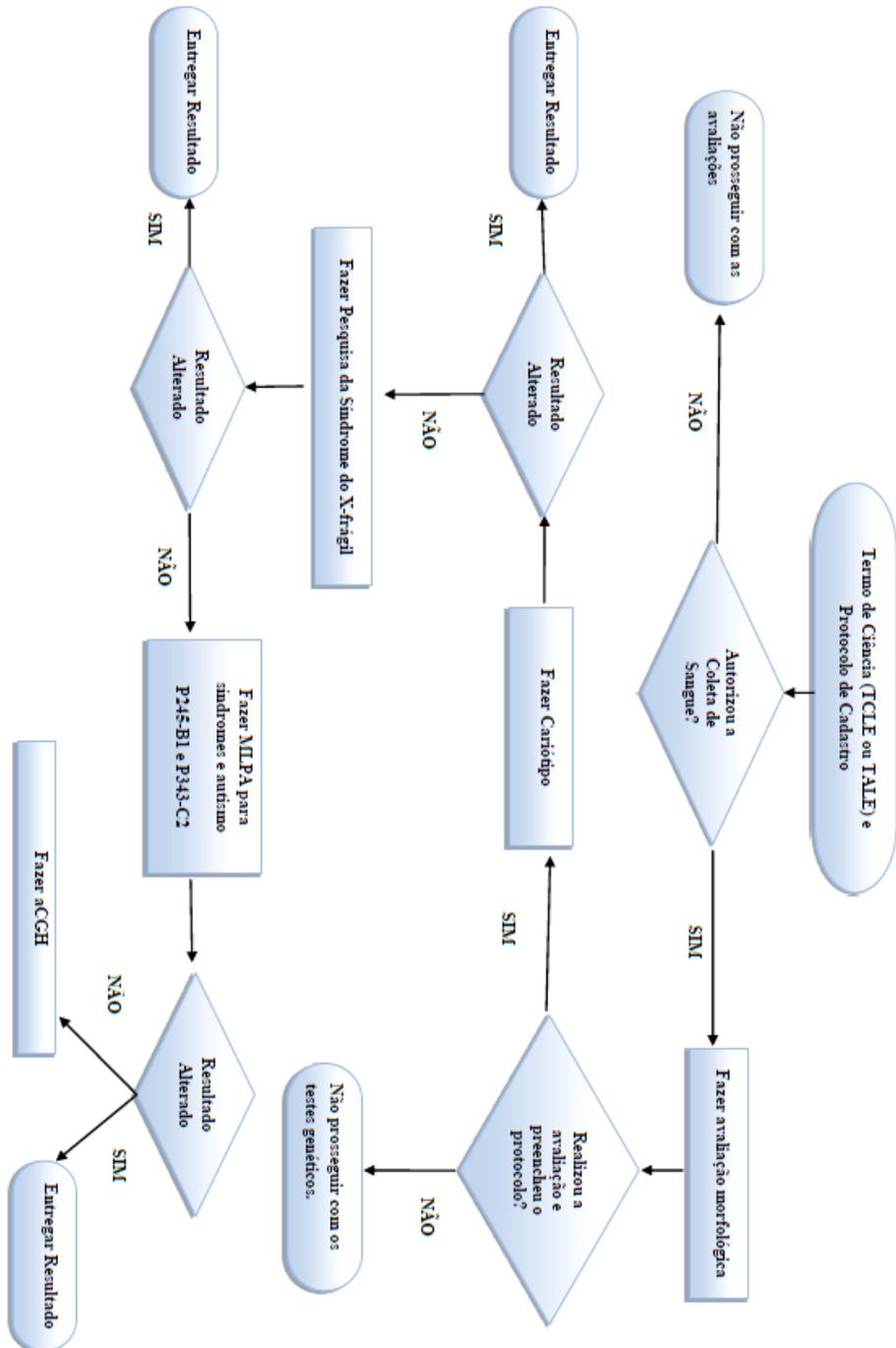
### 2.4.2. Avaliação genético-molecular

#### 2.4.2.1. Coleta das amostras biológicas

Foi realizada coleta de sangue venoso (7 mL) em heparina sódica e (5 mL) EDTA para cultivo celular e extração de DNA, respectivamente.

Os testes genéticos foram realizados de forma escalonada (Fig. 2)

Figura 2: Fluxograma de Atendimento para as Avaliações



### 2.4.3. Cariótipo com bandamento G

O cariótipo e utilizando para identificação de alterações numéricas e estruturais nos cromossomos, sua realização na pesquisa foi um critério de exclusão para outras síndromes associadas.

#### 2.4.3.1. Preparo da amostra para cariótipo

Para realização do cariótipo com bandamento G foram coletados 7 mL de sangue total em heparina sódica. O cultivo celular foi estabelecido em até 48 horas após a coleta.

#### 2.4.3.2. Cultura de células

Para cada amostra foram usados dois tubos cônicos em duplicata, contendo 5 mL do meio RPMI-1640. Em cada um dos tubos de cultura, foi adicionado 400 µL de sangue total. Os tubos foram identificados de acordo com a numeração gerada no Protocolo de Cadastro e deixados em estufa a 37°C por 72 horas. Após este período, foi adicionado aos tubos de cultura 20 a 30 µL de *colcemid* a 10 µg/mL. Os tubos de cultura foram homogeneizados e deixados em estufa a 37°C por mais 20 a 30 minutos.

#### 2.4.3.3. Preparação citológica

As amostras em duplicata foram adicionadas a um único tubo, que foi posteriormente centrifugado a 1.200 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pacote celular homogeneizado. Em seguida, foi acrescentado um total de 8 mL de solução hipotônica KCl 0,075 M pré-aquecida a 37°C, sendo que os primeiros 4 mL foram acrescentados de 1 mL em 1 mL, e os 4 mL restantes de 2 mL em 2 mL em homogeneização constante de maneira suave. O tempo de ação da solução hipotônica foi cronometrado por 14 minutos e ao final deste tempo foi acrescentado 1,0 mL de solução fixadora na proporção 3:1 de metanol (MERCK®) e ácido acético (MERCK®). A amostra foi novamente homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e adicionado 5 mL de solução fixadora gelada. Este processo foi repetido até que o sobrenadante estivesse claro. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a próxima etapa.

#### 2.4.3.4. Confecção de lâminas

Os tubos com amostras fixadas foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos para troca do fixador. O sobrenadante foi descartado, e em seguida acrescentado 5 mL de solução fixadora a 3:1 de metanol (MERCK®) e ácido acético (MERCK®). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente. Em seguida, parte do sobrenadante foi novamente descartado a fim de concentrar o material. Foram pingadas três gotas do material sobre a lâmina (PERFECTA®) limpa e resfriada em água ultrapura na geladeira. O gotejamento ocorreu no período de 15 a 25 segundos, de forma que o material se espalhasse completamente na lâmina, e em seguida, as lâminas foram colocadas em chapa aquecida a 40°C até secarem completamente e ocorrer a fixação das metáfases à superfície da lâmina e acondicionadas em estufa numa faixa de 50°C a 60°C por 24 horas.

#### 2.4.3.5. Coloração das Lâminas

As lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina por 3 a 16 segundos e em seguida em tampão Dulbecco's. As lâminas foram coradas por 1 a 2 minutos com corante Giemsa-Wright diluído em tampão fosfato pH 6.8 a 6.9, em posteriormente lavadas com água tipo I.

#### 2.4.3.6. Análise citogenética

As amostras foram cadastradas no sistema e analisadas automaticamente no *Applied Spectral Imaging* (ASI) (Applied Biosystems, EUA). Duas lâminas de cada paciente foram coradas e colocadas para fotografar as células em metáfase. Pelo menos 5 metáfases de cada amostra foram analisadas no sistema, onde os cromossomos foram individualizados, pareados e contados com a conferência do analista. Após esta etapa, foi feita a comparação simultânea das 5 metáfases cariotipadas para avaliação da estrutura dos cromossomos. A análise foi completada manualmente no sistema para uma contagem de no mínimo 20 células em metáfase e resolução de 400 a 450 bandas.

O resultado foi descrito conforme o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 2016).

#### 2.4.4. Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction- PCR) para o gene fragile X mental retardation 1 (*FMRI*)

A pesquisa molecular de cromossomo X frágil envolve a análise epigenética de uma ilha CpG localizada na região promotora do gene *FMRI*, onde o número de repetições CGG determinam o grau de metilação da região e, conseqüentemente, o nível de expressão gênica. Para a realização do diagnóstico molecular do X frágil, utilizamos a metodologia proposta por Zhou *et al* (2004, 2006) cujo trabalho adaptou a análise de fragmentos em sistema de eletroforese capilar.

##### 2.4.4.1. Preparo das amostras

A extração do DNA foi realizada com o kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen®), utilizando o protocolo de sangue total do fornecedor. As amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, EUA), normalizadas para uma concentração de 100 ng/μL.

Neste ensaio, 2 μg DNA genômico foi tratado com o Kit *EpiTect Bisulfite Handbook* (Qiagen® Hilden, Alemanha) conforme protocolo do fornecedor para sangue. O DNA genômico foi modificado com bissulfito de sódio, para converter todas as citosinas não metiladas no genoma em uracila, deixando as citosinas metiladas intactas (CLARK *et al.*, 2006).

##### 2.4.4.2. PCR para o gene *FMRI*

O ensaio foi modificado em relação ao método descrito por Zhou *et al.*, (2004, 2006). Este métodos requer a combinação de 3 reações de PCR separadas (para os protocolos ver Anexos VI e VII). Realizamos apenas 2 reações de PCR, direcionado para alelos não metilado e metilados acima de 200 repetições CGG. A primeira reação utilizou um par de iniciadores marcado com o hexaclorofluoresceína na sequência *sense* para a análise do número de repetições CGG não convertidas pelo bissulfito de sódio. A

segunda reação utilizando um trio de iniciadores, onde o iniciador *sense* foi marcado com NED<sup>TM</sup>, e os outros iniciadores antisense não possuíam marcação fluorescente.

A técnica mTP-PCR uma adaptação do PCR convencional com *triplet-primer* sensível à metilação, uma estratégia de Warner e colaboradores em 1996. Amplificação com 3 iniciadores; um iniciador *sense* marcado com NED<sup>TM</sup> a montante da repetição, um iniciador antisense com cauda não marcada emparelhamento dentro da repetição metilada modificada e um segundo iniciador antisense não marcado específico para o segmento caudal do primeiro iniciador antisense.

Concentrações e quantidades de reagentes utilizados na PCR para o gene *FMRI*, assim como o programa de amplificação e parâmetros para eletroforese capilar estão descritos no Anexo VI.

#### 2.4.4.2.1. Cálculo para a determinação do número de repetições CGG

O cálculo foi determinado considerando o tamanho do fragmento amplificado e a posição dos iniciadores na região repetitiva do triplete CGG na reação 1.

$$(\text{Fragmento amplificado em pb} - 168 \text{ pb}) / 3 = \text{Número de repetições CGG}$$

#### 2.4.4.3. Kit AmplideX® PCR/CE FMR1

Para garantir a reprodutibilidade devido às alterações do protocolo de Zhou *et al.* e colaboradores em 2004 e 2006, resultados alterados e homozigotos para o sexo feminino foram confirmados com o kit AmplideX® PCR/CE FMR1®. Este kit utiliza três iniciadores para repetição primária CGG em apenas uma reação com DNA genômico. Os reagentes de PCR incluem iniciadores específicos do gene e para região CGG, um tampão, enzima taq polimerase para amplificação da região repetitiva no gene *FMRI*, diluente e um padrão de peso molecular ROX 500. O tamanho dos produtos de PCR é convertido para o número de repetições CGG usando fatores de conversão de tamanho e mobilidade de acordo com o aparelho de eletroforese capilar.

O protocolo para reação de PCR para o kit AmplideX® PCR/CE FMR1®, assim como o programa de amplificação e parâmetros para eletroforese capilar estão descrito no Anexo VII.

2.4.4.3.1. Cálculo para a determinação do número de repetições CGG no Kit AmplideX® PCR/CE FMR1

O cálculo foi determinado considerando a mobilidade do fragmento migrado no sequenciador ABI3730 (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) conforme orientações do fornecedor.

$$(\text{Fragmento amplificado em pb} - 229,4\text{pb}) / 2,965\text{pb} = \text{Número de repetições CGG}$$

2.4.5. Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA)

A realização dos testes prosseguiu com a combinação de dois kits de SALSA MLPA para análises de síndromes associadas ao TEA conforme Jehee (2011) e Moreira et al (2014): o kit SALSA MLPA P245-B1 probemix síndromes de microdeleções e microduplicações para 21 síndromes distintas e o kit SALSA MLPA P343-C2 para regiões cromossômicas comuns já relacionados com TEA; 15q11-q13 (incluindo UBE3A, GABRB3 e a região de microdeleção 15q13 com CHRNA7), a região de microdeleção 16p11 e o gene SHANK3 em 22q13.

2.4.5.1. Princípio do Método e Modificações no protocolo

MLPA® é um método baseado em PCR semi-quantitativo, cujo objetivo consiste em detectar alterações no número de cópias de sequências de DNA, quando comparado à uma amostra referência e com sondas de referência.

A técnica é capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes simultaneamente. A reação de MLPA pode ser dividida em cinco etapas principais: 1) Desnaturação do DNA e hibridização das sondas; 2) Reação de ligação; 3) Reação de PCR; 4) Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar; e 5) Análise dos resultados.

Estas sondas possuem dois oligonucleotídeos distintos, de sequência exclusiva e complementar ao DNA alvo. Durante a hibridização se a sequência alvo da sonda estiver presente na amostra, as duas sondas irão hibridizar. Quando as duas sondas hibridizam na sequência alvo de maneira correta e ficaram adjacentes, elas serão unidas pela enzima ligase durante a reação de ligação (passo 2). Apenas as sondas unidas serão amplificadas exponencialmente durante a reação de PCR (passo 3), e somente estes produtos conseguirão gerar um sinal. Os produtos da amplificação são separados utilizando eletroforese de capilar (passo 4) e a análise realizada (passo 5) através do programa Coffalyser.Net (MRC-Holland) específico para a metodologia.

O protocolo original de (SCHOUTEN et al., 2002) encontra-se disponível em: (<https://www.mlpa.com>). As modificações realizadas no protocolo para este estudo encontram-se no protocolo reduzido no Anexo VIII.

#### 2.4.5.2. Preparo das Amostras

A extração do DNA foi realizada com o Kit *commercial QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen), protocolo do fornecedor, quantificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) e normalizadas para uma concentração de 125 a 150 ng/ $\mu$ L. Amostras com concentração de DNA inferior ao recomendado e relações 260/280 nm abaixo de 1,7 e 260/230 nm abaixo de 1,9 foram descartadas e o DNA extraído novamente com um protocolo modificado (Anexo V)

Para a reação, foram utilizados 2,5  $\mu$ L da diluição DNA a 50 ng com o reagente de eluição para o Kit SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2 em tubos de 0,2 mL devidamente identificados, de modo que volume final não ultrapassasse 2,5  $\mu$ L.

O protocolo reduzido para reação dos kits SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2, assim como as modificações, programa de amplificação e parâmetros para eletroforese capilar estão descrito no Anexo VIII.

#### 2.4.5.3. Análise dos Resultados da MLPA

Após a eletroforese capilar, a análise comparativa dos fragmentos presentes no eletroferograma foi realizada utilizando o programa *Coffalyser.Net* (MRC-Holland). Através deste programa foi possível verificar a altura dos picos obtidos a partir de cada produto de amplificação. Os dados obtidos refletem o número relativo de cópias de cada sonda.

Os dados brutos das corridas foram adicionados ao programa *Coffalyser.Net* (MRC-Holland). O programa é capaz de indicar quais corridas ficaram de boa qualidade e se foi possível a realização adequada da normalização intra-amostal e inter-amostal. Na normalização intra-amostal, cada sonda teste é comparada com a média dos valores de todas as outras sondas da mesma amostra, essa etapa é importante para corrigir oscilações da reação.

Na normalização inter-amostal, a sonda de cada paciente, é dividida pela média de cada sonda correspondente nas amostras controle. Para a realização desta etapa, foram incluídas quatro amostras controle (sem alteração genética) no respectivo kit. Nesse protocolo, os valores foram considerados normais quando a área do pico relativo estava entre 0,8 e 1,2 para o kit SALSA MLPA P245-B1 e 0,7 e 1,3 para o kit SALSA MLPA P343-C2, considerando-se duas cópias da sequência analisadas. Já os valores inferiores a 0,8 e 0,7 indicavam deleção; uma cópia, e valores superiores a 1,2 e 1,3 indicavam duplicação, três cópias, respectivamente. O resultado final da análise gerou um gráfico de razão com todas as sondas do respectivo kit MLPA juntamente com os valores limites para normalidade e uma tabela com o número de cópias de cada região alvo além de sondas que determinam o sexo conforme a Anexo IX Descrição do kit SALSA MLPA P245-B1, e Anexo X Descrição do kit SALSA MLPA P343-C2.

## 2.5. Análises estatísticas

Os dados contínuos foram descritos através de medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio-padrão, valores mínimo e máximo) e os dados categóricos foram descritos em valor absoluto e percentual, utilizando-se o Programa Excel. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para estimar a proporção de detecção nos testes genéticos, tendo sido estimados usando-se o software *Confidence Interval Calculator* (2013).

<https://www.pedro.org.au/portuguese/downloads/confidence-interval-calculator/>.

### 3. Resultados

#### 3.2. Dados Clínicos e Demográficos

##### 3.2.1. Descrição das crianças e adolescentes

Foram incluídas 65 crianças e adolescentes de 2 a 17 anos (idade média  $10\pm 3,21$  anos), sendo 80% do sexo masculino (Tabela 2).

Dados clínicos não puderam ser obtidos para todas as crianças por motivos: ausência da informação na caderneta da criança, no prontuário e/ou desconhecimento da informação por parte dos acompanhantes.

Na história médica pregressa, colhida através da entrevista e consulta no prontuário, a informação sobre a medida do perímetro cefálico (PC) ao nascimento estava disponível para apenas 32 (49%) dos pacientes. Deste, em 8 casos o valor do PC foi  $\leq 32$ cm em recém-nascidos a termo, o limite sugerido pelo Ministério da Saúde para caracterizar Microcefalia.

Informações sobre os valores de Apgar 1' e 5' foram obtidas para 43 crianças e adolescente. Quatro pacientes apresentaram Apgar no primeiro minuto abaixo de 6, e três no quinto minuto.

Baixo peso ao nascimento (inferior a 2500 gramas) ocorreu em 20% do total de 60 descritos.

Outros dados da história clínica mais frequentes (em 62 descritos) foram: relato de sofrimento fetal crônico em cinco pacientes e um com Crescimento Intrauterino Retardado (CIUR) ao ultrassom fetal, icterícia neonatal em 10, diagnóstico de epilepsia em quatro crianças. Histórico de sepse neonatal ocorre em três crianças.

Dados de IMC (índice de massa corporal) atual foram calculados utilizando o método indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para cálculo de IMC baseado na faixa etária e classificado em percentis, levando-se em consideração o sexo e a idade. Encontramos, em 52 crianças e adolescentes, (37%) com IMC adequado, (37%) obesidade e (27%) com sobrepeso.

**Tabela 2:** Dados demográficos e clínicos das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

<b>DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>
Total de meninos	52	80
Total de meninas	13	20
<b>TOTAL DE AMOSTRAS</b>	<b>65</b>	
<b>Idade média das crianças e adolescentes</b>	<b>10</b>	
<b>Desvio padrão (±)</b>	<b>3,21</b>	
<b>Idade gestacional média</b>	<b>38</b>	
<b>Desvio padrão (±)</b>	<b>2,86</b>	
<b>Prematuridade</b>	<b>9</b>	
<b>DADOS PRÉ-, PERI- E PÓS- NATAIS</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>TOTAL DE PC (perímetro cefálico)</b>	<b>32</b>	
PC (média) obtido na amostra em centímetros	34	
<b>Desvio padrão (±)</b>	<b>2,03</b>	
PC ≤32cm	8	
<b>TOTAL DE APGAR 1' DESCRITOS</b>	<b>41</b>	
APGAR 1' -7 a 10	37	90
APGAR 1' - 4 a 6	3	7
APGAR 1' - menor que 4	1	2

<b>TOTAL DE APGAR 5' DESCRITOS</b>	<b>43</b>	
APGAR 5' -7 a 10	40	93
APGAR 5' - menor que 7	3	7
<b>TOTAL DE PESO AO NASCIMENTO DESCRITOS</b>	<b>60</b>	
Baixo peso (inferior a 2500g)	8	13
Muito baixo peso (inferior a 1500g)	3	5
Extremo baixo peso (inferior a 1000g)	1	2
Total de baixo peso	<b>20</b>	<b>33</b>
<b>DIAGNÓSTICO INICIAL AO NASCIMENTO RELEVANTES</b>		
CIUR - crescimento uterino restrito	1	0,62
Icterícia	10	6,2
Epilepsia	4	2,48
SEPSE - septicemia	3	1,86
Sofrimento fetal crônico	5	3,1
<b>IMC (índice de massa corporal) atual</b>		
IMC adequado	19	37
IMC sobrepeso	14	27
IMC obesidade	19	37

### 3.2.2. Descrição materna

A idade média materna ao nascimento foi  $29 \pm 8,62$  anos. Obtivemos 17 mães com faixa etária de 30 a 35 anos e 12 mães com faixa etária de 35 a 45 anos ao nascimento.

No período pré-natal, as alterações e comorbidades mais encontradas foram: pré-eclâmpsia em nove mães (13,85%), sendo que em cinco casos houve parto prematuro, diabetes gestacional em três (4,6%), hepatite B e tabagismo em duas (3,1%). As demais comorbidades encontradas nas 62 mães das crianças e adolescentes estão relacionadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Dados demográficos e clínicos das mães das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

<b>DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS MATERNOS</b>	
	<b>n</b>
<b>Idade média materna ao nascimento</b>	29
<b>Desvio Padrão (<math>\pm</math>)</b>	8,62
Mães com faixa etária de 30 a 35 anos	17
Mães com faixa etária de 35 a 45 anos	12

<b>DIAGNÓSTICO INICIAL MATERNO</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Alergia	1	0,62
Alcoolismo	1	0,62
Anemia	1	0,62
Citomegalovírus materno	1	0,62
Colestase	1	0,62
Depressão materna	1	0,62
Descolamento da placenta	1	0,62
Diabetes gestacional	3	1,86
Hemorragia cerebral	1	0,62
Hepatite B	2	1,24
Hipoglicemia	1	0,62
Hipertireoidismo	1	0,62
Hipotireoidismo	1	0,62
Proteinúria	1	0,62
Tabagismo	2	1,24
TDAH materno	1	0,62
Trombose + Labirintite	1	0,62

### 3.3. Avaliação genético-molecular

O Protocolo de Cadastro do presente estudo (Anexo IV) foi obtido para os 65 pacientes da amostra, mas informação detalhada foi obtida apenas 62 pacientes. Além disso, foi possível revisar o prontuário de 62 casos. Para três pacientes, não foi possível obter informações clínicas relevantes no Protocolo de cadastro e no prontuário. Entretanto, como a amostra biológica havia sido cedida, estes pacientes foram incluídos nos testes moleculares. A descrição dos diagnósticos ou impressão diagnóstica obtida para os 65 pacientes, para os quais obtivemos dados clínicos é apresentada no Anexo XI - Tabela de dados clínicos das crianças e adolescentes. Em apenas 14 (23%) dos 62 pacientes para os quais os dados clínicos estavam disponíveis, foi descrito o CID-F84 com ou sem especificação de comorbidades. Uma impressão diagnóstica sem atribuição de CID foi descrita no prontuário para 27 (44%) pacientes. Portanto, em 21 pacientes não houve diagnóstico descrito no prontuário. O detalhamento é fornecido na Anexo XVII - Tabela de dados clínicos das crianças e adolescentes.

#### 3.3.1. Avaliação Morfológica

A avaliação morfológica foi feita em conjunto com geneticista clínico, a partir das fotografias dos pacientes. Os pacientes (62) foram classificados em 3 grupos: dismorfismos relevantes ocorreram em 25 casos (40%), dismorfismos leves em 20 (32%) e ausência de dismorfismos em 17 casos (27%).

Dentre os dismorfismos mais observados, “face alongada” foi mais relatado, seguido da “baixa implantação dos cabelos na frente” e “orelhas salientes” (Tabelas 4 e 5)

**Tabela 4.** Descrição dos dismorfismos leves observados nas crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

<b>DESCRIÇÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM PRESENÇA DE DISMORFISMOS LEVES</b>	
HBC 02.1	face alongada, fenda palpebral para cima, nariz com ponte elevada e nariz bulboso, boca filtro curto, leve retrognatia
HBC 03.1	face arredondada, ponte nasal deprimida e ponta arredondada, filtro naso-geniano curto, acantose nigricans na região cervical, mãos com pontas dos dedos levemente afiladas
HBC 06.1	olho telecanto(?), nariz columela rebaixada, orelha baixo implantada
HBC 07.1	columela abaixo das alas e narinas levemente antevertidas, filtro naso-geniano longo e pouco marcado
HBC 08.1	olhos epicanto/pregas epicantais /telecanto (?), boca filtro bem marcado, face média levemente hipoplásica
HBC 10.1	boca filtro curto, braços alongados em relação ao tronco, dedos com pontas afiladas, clinodactilia 5º dedo(?)
HBC 15.1	face média hipoplásica, fendas palpebrais desviadas para cima nariz um pouco bulboso, diastema de incisivos centrais superiores, leve retrognatia
HBC 17.1	filtro labial pouco marcado, lábios finos, nariz ponta bulbosa, orelhas de salientes, leve hipoplasia malar
HBC 22.1	impressão de alta estatura constitucional, orelhas salientes, mãos grandes
HBC 28.1	lordose (hipotonia de abdome)
HBC 31.1	cabelo de implantação baixa na frente, frente curta, sobrancelhas arqueadas, ponte nasal alta
HBC 32.1	turricéfalia (?)
HBC 36.1	orelhas em salientes, dedos filiformes
HBC 44.1	face hipotônica, boca entreaberta
HBC 46.1	baixa implantação dos cabelos na frente, miopia, elevada filtro marcado

HBC 50.1 orelhas salientes, hélices grandes, olheiras profundas

HBC 56.1 impressão de turricefalia, orelhas grandes

HBC 58.1	sobrelhas esparsas, diastema de incisivos centrais superiores, olheiras profundas, mancha hiperocrômica no queixo, com aproximadamente 1,5 x 1,5 cm
HBC 59.1	orelhas com implantação normal e hélices pouco desenvolvidas, boca com filtro longo pouco marcado, lábios superior fino
HBC 61.1	retrognatia leve, columela alongada, ponta bulbosa, dedos filiformes

**Tabela 5.** Descrição das crianças e adolescentes com dismorfismos relevantes e diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG.

<b>DESCRIÇÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM PRESENÇA DE DISMORFISMOS RELEVANTES</b>	
HBC 05.1	olhos pequenos e sobrancelhas arqueadas, nariz ponta nasal alta e nariz bulbosa, boca leve prognatismo, orelha baixo-implantada, cabelo de implantação baixa na frente
HBC 09.1	olhos grandes, fendas palpebrais , nariz ponte alta e ponta elevada e narinas antevertidas, boca filtro longo, orelhas baixo-implantadas, com anti-hélices proeminentes, hipoplasia malar
HBC 11.1	cabelo baixo implantado na frente, fendas palpebrais levemente oblíquas para cima, hipoplasia nasal, ponte nasal baixa, nariz curto e bulboso, comissura labial voltada para baixo, orelhas salientes, mento proeminente, sem prognatismo
HBC 13.1	olhos implantação funda nas órbitas, pequenos com fenda para cima, ponte nasal deprimida, pequeno e fossa nasal pequena, boca em tenda, filtro curto, pescoço curto, baixa implantação de cabelo na frente, dedos levemente filiformes, obesidade
HBC 14.1	implantação baixa de cabelo frente, olhos pequenos, nariz ponte alta e narinas antevertidas, orelha baixa implantada, clinodactilia dos 5º dedos, prega mão esquerda em taco de hockey
HBC 18.1	fendas palpebrais inclinadas para baixo, orelhas grandes salientes, face média hipoplásica, malar hipoplásico, face alongada, hipotônica
HBC 19.1	sutura metópica proeminente, alta implantação dos cabelos na testa, olhos telecanto/hipertelorismo, ponte nasal alta, boca ampla/grande, rotação incompleta das orelhas, queixo proeminente
HBC 20.1	microsômico, proporcional
HBC 23.1	impressão de turricéfalia, baixa implantação dos cabelos na frente, ponte nasal alta, orelhas salientes, filtro labial curto, dedos alongados, finos
HBC 24.1	sobrancelhas grossas e arqueadas, orelhas em salientes hélices protusas, leve clinodactilia 5º dedo
HBC 25.1	frente curta, cabelo implantação baixa, ptose palpebral bilateral, fendas palpebrais inclinadas para cima, ponte nasal alargada ponta rebaixada, columela abaixo das alas, aletas antevertidas, pescoço acantose nigricans (?), mão esquerda com prega taco de

	hockey, dedos com pontas afiladas, obesidade
HBC 26.1	cabelo baixo implantado na frente, olhos impressão de telecanto, sobrancelhas arqueadas, nariz ponta elevado, boca filtro longo, lábio superior fino, incisivos grandes e longos, face média hipoplásica
HBC 27.1	alta implantação cabelo na frente, sobrancelhas esparsas, nariz ponte alta e ponta rebaixada columela longa, boca lábios grossos filtro curto, orelhas de salientes baixo implantada
HBC 29.1	turricéfalia, frente ampla com alta implantação dos cabelos, sobrancelhas esparsas, nariz ponta elevada e curto ponte rebaixada, boca filtro curto, face média hipoplásica, queixo proeminente
HBC 30.1	nariz longo, ponta bulbosa, hipoplasia alar, retrognatía
HBC 33.1	cabelo baixo implantados, fendas palpebrais inclinadas para baixo, olheiras profundas, sobrancelhas esparsas, nariz ponte nasal alargada, orelhas baixo implantadas, face média hipoplásica
HBC 35.1	sobrancelhas grossas, nariz bulboso, hipoplasia alar. ponte alta, filtro labial longo, lábios finos, orelhas baixo implantadas (?), hipoplasia malar, retrognatía
HBC 37.1	frente curta, baixa implantação dos cabelos, orelha com rotação incompleta, baixo-implantadas/assimétricas, impressão de palato ogival alto e estreito, dedos com pontas afiladas, falanges distais hiperfletidas (?), auto-mutilação (morde os dedos a ponto de deixar cicatrizes)
HBC 38.1	frente curta com baixa implantação de cabelo, estrabismo divergente, boca diastema de incisivos superiores, orelha lóbulo auricular grande, pescoço curto, abdome proeminente
HBC 42.1	assimetria facial, pálpebras caídas (ptose palpebral?), fendas palpebrais inclinadas para baixo, impressão de telecanto, boca lábio superior fino, nariz ponte alongada, orelha baixo implantada e rodada posteriormente
HBC 48.1	face média plana, olhos impressão de telecanto, nariz tubular ponte alongada, orelha baixo implantada com dobras anômalas, boca com filtro curto
HBC 49.1	mãos com polegar digitalizado e distal, nariz curto ponte elevada, boca filtro longo, lábio superior invertido
HBC 55.1	face alongada e face média plana, fendas palpebrais oblíquas para cima, sinofris, lábios grossos, orelha de salientes, retrognatía
HBC 64.1	baixa implantação dos cabelos na frente, sinofris, ponte nasal elevada e ponta bulbosa,

	boca filtro curto, lábios proeminentes, retrognatia leve, face alongada, mãos dedos longos e finos, pregas palmares com transversa incompleta à esquerda
HBC 65.1	face alongada, orelha grandes e salientes, fenda palpebral para baixo, nariz ponte e dorso elevado, boca filtro curto pouco marcado, mãos com a ponta dos dedos alargadas (baqueta), clinodactilia de 5º dedo, prega palmar transversa à direita

### 3.3.2. Resultados dos Testes Genéticos

#### 3.3.2.1. Cariótipo com bandamento G

Não foram detectadas alterações cromossômicas estruturais ou numéricas em quaisquer das 65 amostras de crianças e adolescentes avaliadas. Em três pacientes encontramos variações cromossômicas normais na população. Quando a qualidade técnica obtida nas imagens não estava boa, as análises foram realizadas manualmente. Exemplos das imagens dos cariogramas obtidas estão apresentadas na (Fig. 3) (sexo masculino) e (Fig. 4) ( sexo feminino).

Figura 3 - Cariograma paciente do sexo masculino- HBC 26.1



Figura 4 - Cariograma paciente do sexo feminino -HBC 38.1



### 3.3.2.2. PCR para o gene *FMR1*

Em 65 amostras analisadas para pesquisa do número de repetições CGG no gene *FMR1*, encontramos um paciente alterado, com 92 repetições CGG, ou seja, compatível com pré-mutação (HBC 65.1 - sexo masculino), usando o protocolo de Zhou e colaboradores (2004; 2006). Esta alteração foi confirmada na mãe. Este exame foi repetido com o uso do kit AmplideX® PCR/CE FMR1, que apontou a existência de uma mutação completa (ver discussão abaixo). A frequência observada de alterações em FMR1 foi de 1,5% (IC-95% - 0,27%-8%). Resultados apresentados abaixo (Fig. 5).

Figura 5: Descrição clínica e eletroferograma do paciente HBC 65.1, método de Zhou et al., 2004;2006 para o gene *FMR1* e AmplideX® PCR/CE FMR1

Descrição clínica:

#### **HBC 65.1**

#### **DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

**Sexo:** masculino

**Idade:** 6 anos

**Peso ao nascimento:** 3,320 gr

**Comprimento ao nascimento:** 51cm

**Perímetro Cefálico (PC):** 36 cm

**Apgar:1':** 4

**5':** 9

**Idade gestacional (IG):** 41 semanas

**Parto:** normal

**Pré-natal:** Hipóxia.

**Peso atual:** 20,5 kg

**Altura:** 1,20cm

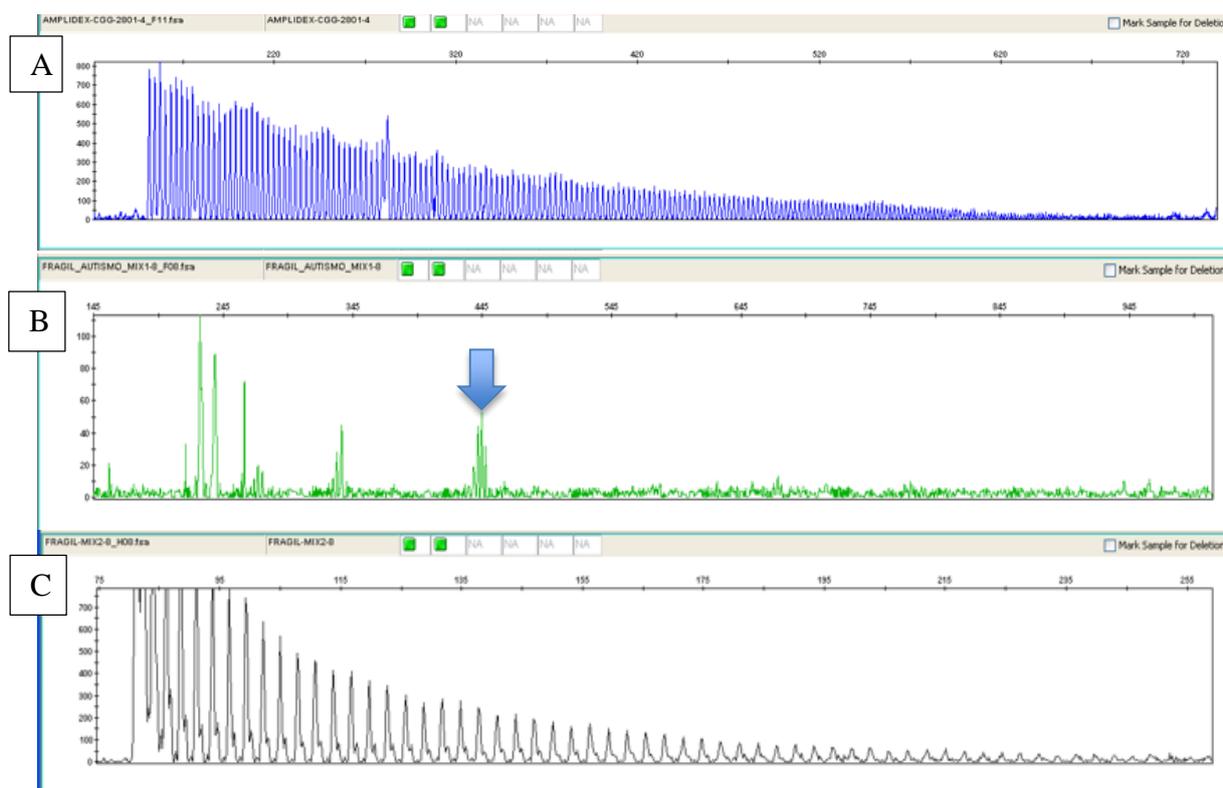
#### **AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR**

**Avaliação da morfologia:** presença de dismorfismos relevantes.

**Descrição:** face alongada, orelha grandes e salientes, fenda palpebral para baixo, nariz ponte e dorso elevado, boca filtro curto pouco marcado, mãos com a ponta dos dedos alargadas (baqueta), clinodactilia de 5º dedo, prega palmar transversa à direita

# HBC 65.1





Legenda - A; eletroferograma do paciente HBC 65.1 com mutação completa realizado com o kit AmpliDex® PCR/CE FMR1. B; eletroferograma com a reação de alelos não metilados do paciente HBC 65.1 com pre-mutação realizado com a metodologia de Zhou et al., 2004;2006. C; eletroferograma com a reação de alelos metilados do paciente HBC 65.1 com perfil de mutação completa realizado com a metodologia de Zhou et al., 2004;2006.

Notas: as identificações geradas no eletroferograma corresponde a posição do protocolo de execução do teste e não da amostra.

Apenas uma de 14 meninas foi homocigota para este polimorfismo usando-se o usando o protocolo de Zhou e colaboradores (2004; 2006). Este resultado foi confirmado com o kit AmplideX® PCR/CE FMR1.

Além disso, o tamanho do alelo estimado usando-se o protocolo de Zhou e colaboradores (2004; 2006) foi diferente do tamanho estimado usando-se o kit AmplideX® PCR/CE FMR1 conforme dados da Tabela 11.

**Tabela 6:** Comparação entre os resultados da estimativa do tamanho da repetição CGG à 5' do gene FMR1, conforme as técnicas de Zhou et al, 2004,2006 e o kit AmplideX® PCR/CE FMR1

Identificação	Sexo	Resultado da síndrome X-FRÁGIL Nº REPETIÇÕES CGG (Zhou et al., 2004, 2006)	Resultado da síndrome X-FRÁGIL Nº REPETIÇÕES CGG (AmplideX®PCR/CE FMR1)
HBC 04.1	M	25	31
HBC 10.1	M	26	32
HBC 25.1	F	22 e 27	28 e 32
HBC 31.1	F	26	32
HBC 44.1	M	16	23
HBC 53.1	F	20 e 26	25 e 32
HBC 65.1	M	92	Mutação completa

Nota: Observamos a diferença de ( $\pm$ ) 6 repetições da trinca CGG.

### 3.3.2.3. MLPA

Na análise utilizando-se o Kit SALSA MLPA P245-B1 para síndromes genéticas mais frequentes, encontramos quatro resultados alterados em 62 amostras (3,22%, IC-95: 0,89-11%):

1. paciente (HBC 25.1 - sexo feminino) apresentou uma deleção em heterozigose da região 22q13 associada à Síndrome de Phelan-McDermid, detectada com as sondas SHANK3 (12031-L13828) e RABL2B (06734-L05558). Esta alteração também foi detectada com o kit SALSA MLPA P343-C2, detectada com a sonda SHANK3 exon 3 (06784-L06376), exon 15 (14190-L15800) e exon 22 (06787-L07383), representados na (Fig. 6).

Descrição clínica:

#### **HBC 25.1**

#### **DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

**Sexo:** feminino

**Idade:** 15 anos

**Peso ao nascimento:** 2.970 gr

**Comprimento ao nascimento:** 49 cm

**Perímetro Cefálico (PC):** não estava presente no prontuário

**Apgar 1':** não estava presente no prontuário

**5':** não estava presente no prontuário

**Idade gestacional (IG):** 40 semanas

**Parto:** cesáreo

**Pré-natal:** Sofrimento fetal. Icterícia.

**Peso atual:** 97,9 kg

**Altura:** 1,65 cm

#### **AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR**

**Avaliação da morfologia:** presença de dismorfismos relevantes.

**Descrição:** fronte curta, cabelo implantação baixa, ptose palpebral bilateral, fendas palpebrais inclinadas para cima, ponte nasal alargada ponta rebaixada, columela abaixo das alas, aletas antevértidas, pescoço acantose nigricans (?), mão esquerda com prega taco de hockey, dedos com pontas afiladas, obesidade.

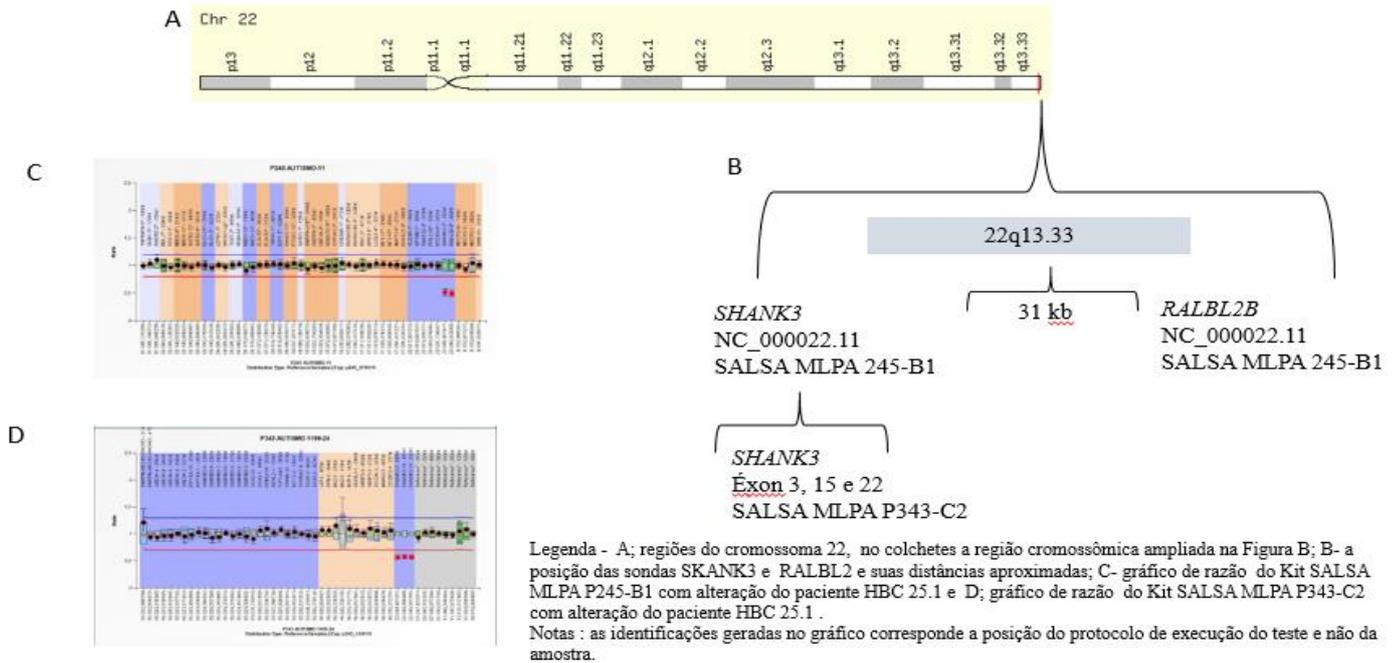
Figura 6. A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA da paciente HBC 25.1 com a posição cromossômica das sondas

A)



Figura 6. A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA da paciente HBC 25.1 com a posição cromossômica das sondas

B)



2. paciente (HBC 13.1 - sexo masculino apresentou uma deleção em heterozigose na região 15q24 no paciente, detectada pelas sondas SEMA7A (18316-L23369) e CYP1A1 (06811-L22815), compatível com o diagnóstico de Síndrome de Witteveen-Kolk ou Síndrome da deleção 15q24 representados na (Fig. 7).

Descrição clínica:

### **HBC 13.1**

#### **DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

**Sexo:** masculino

**Idade:** 12 anos

**Peso ao nascimento:** 3.350g

**Comprimento ao nascimento:** 49 cm

**Perímetro Cefálico (PC):** 36 cm

**Apgar 1':** não estava presente no prontuário      **5':** 10

**Idade gestacional (IG):** 40 semanas

**Parto:** cesáreo

**Pré-natal:** Bolsa rota há mais de 12 horas. Icterícia

**Peso atual:** 120kg

**Altura:** 1,65 cm

#### **AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR**

**Avaliação da morfologia:** presença de dismorfismos relevantes.

**Descrição:** olhos implantação funda nas órbitas, pequenos com fenda para cima, ponte nasal deprimida, pequeno e fossa nasal pequena, boca em tenda, filtro curto, pescoço curto, baixa implantação de cabelo na frente, dedos levemente filiformes, obesidade

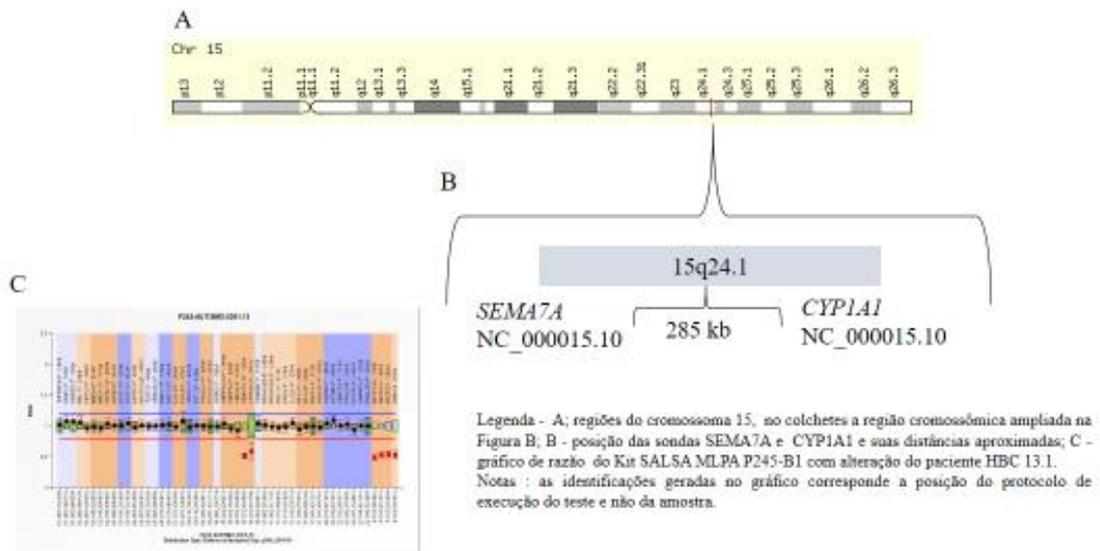
Figura 7. A - Aspecto físico da paciente; B -Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 13.1 com a posição cromossômica das sondas

A)



Figura 7. A - Aspecto físico da paciente; B - Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 13.1 com a posição cromossômica das sondas

B)



3. Em dois pacientes (HBC 12.1 - sexo masculino) e (HBC 20.1. sexo masculino) foi detectada uma deleção de apenas uma sonda SNRPN (12178-L13826) da região 15q11.2. Estes resultados não puderam ser repetidos e o resultado obtido com kit SALSA MLPA P343-C2 não confirma a existência de uma deleção nesta região. Pequenas deleções nesta região têm sido descritas na literatura, mas são raras. Consequentemente, estes resultados são considerados duvidosos e ficam pendentes de confirmação por outros métodos (repetição da MLPA ou aCGH) (Fig. 8).

Descrição clínica:

### **HBC 12.1**

#### **DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

**Sexo:** masculino

**Idade:** 6 anos

**Peso ao nascimento:** 3.075gr

**Comprimento ao nascimento:** 48,5 cm

**Perímetro Cefálico (PC):** 34 cm

**Apgar:1':** 8

**5':** 8

**Idade gestacional (IG):** 42 semanas

**Parto:** normal

**Pré-natal:** Ruptura do cordão uterino no momento do parto. Sofrimento fetal

**Peso atual:** 23 kg

**Altura:** 1,12 cm

#### **AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR**

**Avaliação da morfologia:** ausência de dismorfismos relevantes

Figura 8. Em A, aspecto físico do paciente HBC 12.1, em B, aspecto físico do paciente HBC 20.1, C, Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 12.1 e HBC 20.1 com a posição cromossômica das sondas

A)



Descrição clínica:

### **HBC 20.1**

#### **DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

**Sexo:** masculino

**Idade:** 7 anos

**Peso ao nascimento:** 2.600 gr

**Comprimento ao nascimento:** 44 cm

**Perímetro Cefálico (PC):** 31cm

**Apgar:1':** 8

**5':** 9

**Idade gestacional (IG):** 39 semanas

**Parto:** normal

**Pré-natal:** Icterícia fisiológica

**Peso atual:** 24 kg

**Altura:** 1,15m

#### **AVALIAÇÃO GENÉTICO MOLECULAR**

**Avaliação da morfologia:** presença de dismorfismos relevantes

**Descrição:** microssômico proporcional

Figura 8. A - aspecto físico do paciente HBC 12.1, em B - aspecto físico do paciente HBC 20.1, C - Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 12.1 e HBC 20.1 com a posição cromossômica das sondas

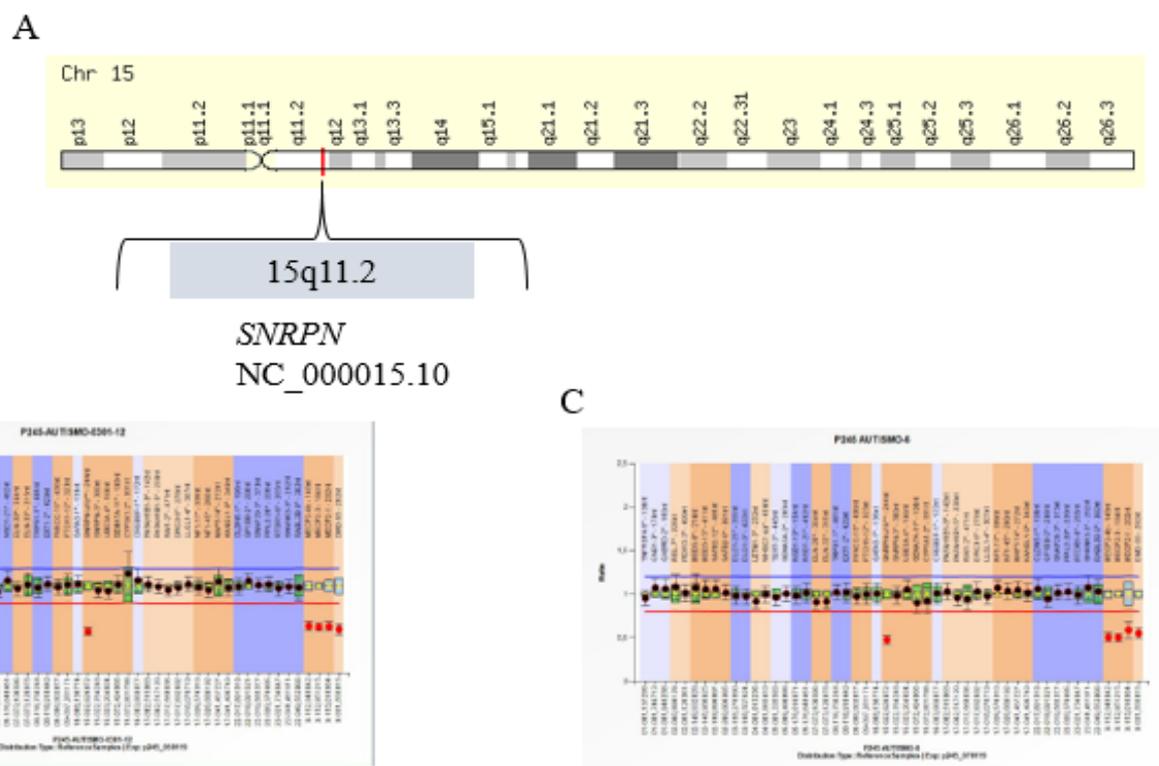
B)

**HBC 20.1**



Figura 8. Em A, aspecto físico do paciente HBC 12.1, em B, aspecto físico do paciente HBC 20.1, C, Resultado do teste genético de MLPA do paciente HBC 12.1 e HBC 20.1 com a posição cromossômica das sondas

C)



Legenda - A; regiões do cromossoma 15, no colchete a posição da sonda SNRPN kit SALSA MLPA P245-B1; B – gráfico de razão do Kit SALSA MLPA P245-B1 com alteração do paciente HBC 12.1; C - gráfico de razão do Kit SALSA MLPA P245-B1 com alteração do paciente HBC 20.1

Notas : as identificações geradas no gráfico corresponde a posição do protocolo de execução do teste e não da amostra.

Usando-se o kit SALSA MLPA P343-C2 para regiões relacionadas com autismo, encontramos apenas um resultado alterado, com as sondas SHANK3 exon 3 (06784-L06376), exon 15 (14190-L15800) e exon 22 (06787-L07383) para a paciente HBC 25.1- sexo feminino (já referida acima, na descrição dos resultados obtidos para o kit SALSA MLPA P245-B1).

Por outro lado, 14 pacientes apresentaram resultados sugestivos de duplicação para a sonda SNRPN-HB2-85 (12718-L13906) e em alguns casos também para a sonda MAZ (11673-L12444), sugerindo tratar-se de um artefato da técnica ou do experimento. Além disso, quatro pacientes apresentaram resultados sugestivos de deleção da sonda TRPM1. Estes resultados foram repetido e não confirmados, sugerindo então tratarem-se também de artefato de técnica.

Portanto, foi estabelecido um diagnóstico em 49 amostras, sugerindo taxa de detecção de 2% (IC-95% - 0,36%-11%).

Os resultados da MLPA são fornecidos no Anexo XVI na Tabela de dados clínicos das crianças e adolescente. Uma síntese dos resultados e as taxas de detecção do cariótipo, genotipagem da repetição CGG da região não traduzida 5' UTR do gene *FMRI* e das MLPA realizadas são apresentados na tabela 10.

**Tabela 7** - Resultados dos testes genéticos das crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhados no Ambulatório de Autismo do Hospital das Clínicas da UFMG

	<b>Total de amostras analisadas</b>	<b>Resultados negativos</b>	<b>Resultado alterados</b>	<b>Taxa de detecção de alterações</b>
<b>Cariótipo</b>	65	65	0	0
<b>Síndrome do X-frágil</b>	65	64	1	1,5% (IC-95% - 0,27%-8%)
<b>SALSA MLPA P245-B1</b>	62	60	2	3,2% (IC-95% - 0,89%-11%)
<b>SALSA MLPA P343-C2</b>	49	48	1	2% (IC-95% - 0,36%-11%)
<b>Taxa de diagnóstico global</b>	49	46	3	6,1% (IC-95% - 2,1%-17%)

Nota: um paciente foi diagnosticado por ambos os kits de MLPA.

### 3.4. Avaliação do custo-efetividade de realizar triagem com os kits de MLPA testados, antes do aCGH

A eficiência em serviços de saúde não deve ser entendida apenas como a melhor relação entre o custo e a quantidade produzida; o resultado da aplicação de determinados recursos precisa, atender às necessidades mínimas de efetividade. Desta forma torna-se necessária a avaliação da aplicação de testes genéticos no TEA.

No âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde), a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, oficializada pela Portaria Nº 199, de 30 de janeiro de 2014, publicada pelo Ministério da Saúde, prevê a realização de microarray para investigação etiológica de condições clínicas que envolvem deficiência intelectual. Tanto o sistema público brasileiro quanto o privado ainda não consideram a possibilidade de utilizar o sequenciamento completo do exoma como exame diagnóstico de forma sistemática. De um modo geral, esse teste tem sido custeado pela família ou, em alguns casos, via judicialização (DUARTE, 2018).

Uma estimativa do custo para realização desta pré-triagem com os kits MLPA usados neste projeto, previamente ao aCGH foi comparada ao custo de realizar-se aCGH, apenas.

Em laboratórios comerciais encontramos valores de R\$ 1.500,00 cada MLPA e de R\$ 6.000,00 o aCGH.

Obtivemos dois diagnósticos em 62 pacientes investigados com o kit SALSA MLPA P245-B1. Ou seja, depois de usar este kit, ainda teríamos que realizar aCGH em 60 pacientes. Portanto, os custos com a MLPA + aCGH foi de

$$\text{R\$ } 1500,00 \times 62 = \text{R\$ } 93.000,00,$$

$$+ \quad \text{R\$ } 6.000,00 \times 60 = \text{R\$ } 360.000,00$$

$$\text{Total} = \text{R\$ } 453.000,00$$

Apenas aCGH, o custo seria de

$$\text{R\$ } 6.000,00 \times 62 = \text{R\$ } 372.000,00$$

Ou seja, a triagem com MLPA implicou em um custo adicional de R\$ 81.000,00

Considerando-se o kit SALSA MLPA P343-C1

$$49 \times \text{R\$ } 1500,00 = \text{R\$ } 73.500,00$$

$$+ \quad 48 \times \text{R\$ } 6000,00 = \text{R\$ } 288.000,00$$

$$\text{Total} = \text{R\$ } 361.000,00$$

Apenas aCGH

$$49 \times \text{R\$ } 6.000,00 = 294.000,00$$

Neste caso, o custo da triagem prévia com MLPA implicou em um custo adicional de R\$ 67.000,00.

## 4. Discussão

Na análise dos dados demográficos da amostra estudada, encontramos diferenças em idade materna, frequência de icterícia neonatal, prematuridade, sofrimento fetal e pré-eclâmpsia.

A idade média materna ao nascimento foi de  $29 \pm 8,62$  anos em nossa amostra. Alves Maia et al., 2018, em estudo de caso-controle com 1.134 crianças e adolescentes (o grupo caso compreendeu 248 crianças e adolescentes com TEA e o grupo controle 886 sem diagnóstico deste transtorno), obteve a média de idade da materna ( $29,7 \pm 5,6$  grupo caso;  $27,8 \pm 6,6$  grupo controle) maior no grupo caso quando comparada à do grupo controle, mostrando associação positiva entre TEA e idade materna maior do que a da população em geral. Também no estudo de Sandin et al., 2012, uma meta-análise que incluiu 25.687 crianças com diagnóstico de TEA e 8.655.576 indivíduos controle, encontraram relação entre idade materna avançada e aumento no risco de autismo. Comparou-se mães  $\geq 35$  anos com mães de 25 a 29 anos de idade, o risco relativo (RR) para autismo na prole foi de 1,52 (intervalo de confiança de 95% [IC] = 1,12-1,92). Para mães com menos de 20 anos em comparação com mães de 25 a 29 anos, houve uma redução estatisticamente significativa no risco (RR = 0,76; intervalo de confiança de 95% = 0,60-0,97).

Das 65 amostras de crianças e adolescentes analisadas em nosso estudo, 10 (6,2%) apresentaram história de icterícia neonatal. No estudo de Lozada et. al., 2015, das 2.917 crianças diagnosticadas com TEA, 640 apresentaram história de internação com diagnóstico de icterícia neonatal e 107 receberam tratamento para icterícia, sendo 100% deles por fototerapia. Todavia, análise separada do subgrupo de prematuros resultou em perda da associação significativa entre TEA e icterícia, o tratamento fototerápico também não foi significativamente associado ao TEA. Também no estudo de Maimburg e colaboradores (2008), foi encontrado um risco quase quatro vezes maior de TEA associado à hiperbilirrubinemia. De 461 casos de TEA, 24 pacientes apresentaram icterícia e 20 receberam fototerapia. A análise estratificada em recém-nascidos a termo e pré-termo sugeriu que o risco elevado de autismo após hiperbilirrubinemia foi encontrado apenas em bebês nascidos a termo, corroborando o primeiro estudo. Amin et. al., 2011, em revisão sistemática de literatura sobre icterícia neonatal e TEA em

recém-nascidos a termo e pré-termo, entre 13 estudos incluídos, encontraram uma associação estatisticamente significativa entre icterícia neonatal e autismo (OR 1,43, IC 95% 1,22-1,67,  $p = 0,000$ ); essa associação não foi encontrada em prematuros.

Pré-eclâmpsia foi relatada em 9 (14,5 %) de 62 crianças do nosso estudo. Curran e colaboradores (2017) examinaram o impacto dos distúrbios hipertensivos da gravidez no desenvolvimento do autismo: das 13.098 crianças que foram incluídas na análise, 983 foram expostos a esses distúrbios. Houve 199 casos notificados de autismo, 30 dos quais foram expostos aos distúrbios hipertensivos da gravidez, constatando-se que crianças expostas aos distúrbios hipertensivos tiveram duas vezes mais probabilidade de receberem o diagnóstico de autismo. Uma associação significativa entre pré-eclâmpsia e TEA também foi observada em um estudo (WALKER et al., 2015) com 1061 crianças de gestações com diagnóstico de pré-eclâmpsia (517 crianças com TEA, 350 crianças com desenvolvimento típico e 194 crianças com distúrbio do desenvolvimento). Em uma análise de 87.677 nascimentos de 1996 a 2002, a pré-eclâmpsia/eclâmpsia foi significativamente associada à maior chance de autismo (GUINCHAT et al., 2012).

Sofrimento fetal ocorreu em cinco de 62 indivíduos de nossa amostra. Hadjkacem e colaboradores (2016) realizaram estudo transversal e comparativo de 101 crianças, 50 com TEA e 51 irmãos não afetados. No estudo citado, foi identificada uma prevalência maior de fatores pré-natais, perinatais e pós-natais em crianças com TEA em comparação com seus irmãos não afetados. Os principais fatores perinatais foram sofrimento fetal agudo (26% dos casos), longa duração do parto e prematuridade (18% dos casos em cada fator), dados esses que corroboram os achados do nosso estudo em relação ao maior número de casos de TEA em crianças com histórico de sofrimento fetal.

A idade gestacional média, em nosso estudo, foi de 38 semanas, sendo 13,8 % prematuros. Darcy-Mahoney et al., 2016 investigou se as crianças com prematuridade tardia apresentam o mesmo risco para autismo que as nascidas a termo. Entre as 406 crianças com autismo, 6,7% eram prematuros precoces (<33 6/7 semanas) e 10,6 % eram prematuros tardios (34-36 6/7 semanas). Em comparação com os a termo, tanto as crianças prematuras precoces quanto as tardias tiveram maior risco de desenvolver

autismo, sendo a probabilidade ainda maior quando prematuro precoce. Hadjkacem et al., 2016, em um estudo transversal que incluiu 101 crianças, 50 com TEA e 51 irmãos não afetados, encontraram uma prevalência maior de fatores perinatais, como a prematuridade (18% dos casos), em crianças com TEA em comparação com irmãos não afetados.

Fatores genéticos e eventos pré-natais como hipóxia, diabetes gestacional, uso de medicamentos ou toxemia podem contribuir para Anomalias Físicas Menores (MANOUILENKO et al., 2014). Estima-se que 10 a 20% dos pacientes com TEA, apresentem anormalidades reconhecíveis da morfogênese manifestadas como características dismórficas e podem ser separadas em grupos distintos (SCHAEFER, 2016). Em outros estudos, considerando dados de 1.261 pacientes chineses com TEA, o exame físico que avaliou a presença de características dismórficas permitiu categorizar em grupos dismórficos (10,79%) e não dismórficos (89,21%) (WONG et al., em 2014). Em nossa amostra observamos (40%) de dismorfismos relevantes, conforme impressão do geneticista clínico, nas análises por fotografia. Esta elevada taxa observada pode se dever ao método escolhido, em que a análise por fotografia é influenciada pela qualidade das fotos ou estar relacionada a fatores intrínsecos da nossa amostragem.

A nossa taxa de detecção global com os testes genéticos, utilizando o fluxograma proposto foi de 6,1% (IC-95% - 2,1%-17%) em 49 pacientes para os quais os três métodos foram realizados.

Cariótipo e o teste para Síndrome do X frágil são atualmente recomendados como testes genéticos de primeira ordem para excluir anormalidades cromossômicas pela ANS (Agência Nacional de Saúde, 2018), embora literatura internacional não recomende mais o cariótipo (MILLER et al., 2010).

Em nosso estudo não detectamos alterações ao cariótipo. El-Baz et al., 2015 em um estudo de corte transversal com 30 pacientes com diagnóstico seguindo os critérios de DSM-IV-TR e exames complementares também não encontraram resultados alterados. A utilização do cariótipo no diagnóstico do TEA foi discutida no *Consortium International Standard Cytogenomic Array (ISCA)* em 2010, onde realizaram-se reuniões internacionais e uma revisão da literatura de 33 estudos, incluindo 21.698 pacientes testados pelo aCGH, concluindo que a análise cariotípica de bandas G deve

ser reservada para pacientes com síndromes cromossômicas óbvias (por exemplo, síndrome de Down), uma história familiar de rearranjo cromossômico ou uma história de abortos múltiplos. Deleções e duplicações submicroscópicas ou variantes de número de cópias (CNVs) menores que 3 Mb não são detectadas pelo cariótipo de alta resolução e em um estudo de revisão de Shaffer et al., 2004, já apresentavam estas limitações e sugerem o aCGH para estudo de doenças genéticas mais complexas.

Em um estudo (Shen et al., 2010), o cariótipo resultou em resultados alterados em 19 de 852 pacientes 2,23% (IC95%, 1,73%-2,73%), o teste de X frágil alterado em 4 de 861 0,46% (IC-95%, 0,36%-0,56 %), sendo 2 portadores de pré-mutação e 2 indivíduos com mutação completa.

Para a Síndrome do X-frágil detectamos um resultado discordante conforme o método utilizado. O alelo presente no indivíduo HBC 65.1 foi classificado pré-mutação (92 repetições do triplete CGG), 1,5% (IC-95% - 0,27%-8%), usando-se a metodologia (Zhou et al. 2004; 2006). Com o kit AmplideX® PCR/CE FMR1, este alelo foi classificado com uma mutação completa.

Além disto, uma diferença de 6 repetições foi detectada na estimativa do tamanho do alelo, quando comparados os resultados obtidos para seis indivíduos que foram testados com os dois métodos (Tabela 6). Esta diferença na determinação de do tamanho dos alelos com expansão é crítica e pode ser influenciados por amplificação preferencial na PCR, padrão de peso molecular, sequenciador, matriz dentre outros. A sensibilidade dos métodos baseados em amplificação do DNA é particularmente baixa em indivíduos do sexo feminino. De acordo com o tamanho modal descrito na literatura para todas as populações testadas, a estimativa do tamanho do alelo obtida com o kit AmplideX® PCR/CE FMR1 é a correta. Desta forma, será necessário no futuro repetir a genotipagem da amostra usando o kit AmplideX® PCR/CE FMR1.

O diagnóstico clínico de autismo pode estar associado a síndromes genéticas com características distintas e sua sobreposição com a síndrome pode representar cerca de 2% dos casos de TEA (Shen et al., 2010). Kelleher et al, 2008 encontraram uma frequência de até 5% de doenças monogênicas no TEA. Em uma pesquisa de banco de dados com 433 pacientes encaminhados com TEA, Reddy em 2005 encontrou nos Testes de X Frágil por *Southern blot* e análise de PCR 7/316 (2,2%) com um resultado

alterados, sendo 14% portadores de pré-mutação, com razão de 4,5 homens para 1 mulher.

Hernandez e colaboradores (2009) descreveram sintomas relacionados a TEA em 90% dos homens com Síndrome do X Frágil. Um padrão misto de alelos com mutação completa e de pré-mutação é denominado mosaicismo e também está incluído sob o rótulo FXS. A mutação completa leva à hipermetilação do gene *FMR1*, que, por sua vez, resulta no silenciamento do gene, causando no sexo masculino por comprometimento cognitivo e anormalidades comportamentais. Em meninas com mutação completa, o fenótipo mais frequente é autismo e obesidade a partir da adolescência. Alelos de pré-mutação estão associados a déficits cognitivos mais leves e melhor desenvolvimento de habilidades adaptativas do que alelos de mutação total. No sexo feminino, a pré-mutação leva a falência ovariana prematura.

Uma questão interessante é por que as mutações expansivas em *FMR1* acarretam autismo. Esta questão tem sido investigada em estudos que buscam descrever as interações da proteína FMRP. Em uma comparação dos 842 genes-alvo da proteína FMRP (reguladora da transcrição neuronal) com 117 genes candidatos avaliáveis da base de dados SFARI (<http://gene.sfari.org>) de genes candidatos ao autismo (Basu et al., 2009) revelou uma sobreposição altamente significativa com 28 alvos da FMRP (24 %,  $p = 1,0 \times 10^{-8}$ ), incluindo vários genes candidatos para o TEA, como *NLGN3*, *NRXN1*, *SHANK3*, *PTEN*, *TSC2* e *NF1*.

CNVs são conhecidas por serem as principais alterações que contribuem para o TEA. Existem diferentes técnicas direcionadas para identificar CNVs nos pacientes, incluindo cariotipagem, MLPA e aCGH. O aCGH é considerado o padrão-ouro para estas investigações e seguramente pode aumentar taxa de detecção de anomalias. Embora tenha sido sugerido que análises usando diferente kits de MLPA possam ser alternativas interessantes para diagnóstico de distúrbios do neurodesenvolvimento em países em desenvolvimento (Jehee et al. 2011), os nossos resultados sugerem que esta estratégia não seja custo-eficaz. Desta forma, a indicação de uma triagem inicial por MLPA permaneceria apenas naqueles casos onde há suspeita clínica de uma síndrome genética específica, detectável por aCGH.

Em um estudo com 50 iranianos diagnosticados conforme os critérios de DSM-V para o TEA, Firouzabadi<sup>1</sup> et al., 2016 utilizando a combinação de 4 kits de SALSA MLPA P036-E2, SALSA MLPA P070-B2, SALSA MLPA P343-C1 e SALSA MLPA P396-A1 e encontrou respectivamente alterações nesta mesma ordem de 4/50, 3/50, 2/50 e 0/50. Em outra combinação utilizando os kits de SALSA MLPA P343-B1 e MS-MLPA ME028 (para estudo de metilação) Peixoto et al., 2017, encontraram respectivamente 6/150 e 4/150 com regiões de sobreposição entre os kits. Em nosso estudo utilizamos a combinação dos Kits SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2, e detectamos 2:62 (6,25%; [IC-95%]2,46%-15%) e 1:49 (2%; [IC-95%] 0,36%-11%) respectivamente, com os kits de MLPA. Conseqüentemente, 47 dos pacientes testados com ambos os kit requerem aCGH para investigação.

Com o Kits de SALSA MLPA P245-B1 encontramos duas alterações na região 15q11.2 (deleção em heterozigose), no gene *SNURF* (*SNRPN-upstream reading frame*), relacionada às Síndromes de Prader-Willi e Angelman, detectadas nos pacientes (HBC 12.1 e HBC 20.1). Este gene está localizado dentro da região crítica da Síndrome de Prader-Willi no cromossomo 15. Os transcritos produzidos a partir desse gene se iniciam em um centro de impressão genômica e são paternalmente impressos (GeneReviews® NBK1330, 2019). Nossos achados ainda são prematuros e podem ocorrer resultados falso-positivos devidos a possibilidade de ocorrência de SNPs na região de anelamento das sondas de MLPA, conforme descrito nas instruções do fabricante (<https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx>).

Aproximadamente, 70% dos indivíduos com Síndrome de Prader-Willi e Angelman apresentam deleções em um cromossomo 15 envolvendo as bandas 15q11.2-q13, que podem ser detectadas usando estudos cromossômicos de alta resolução e testes de hibridização fluorescente in situ (FISH) ou microarray cromossômico. Três principais mecanismos moleculares que resultam na Síndromes de Prader-Willi; incluem deleção paterna, dissomia uniparental materna do cromossomo 15 e defeito de *imprinting*. A análise de metilação do DNA é a única técnica que irá diagnosticar a Síndromes de Prader-Willi causada por todos os três mecanismos genéticos, bem como diferenciar a Síndromes de Prader-Willi da síndrome de Angelman em casos de deleção.

A deleção em heterozigose na região 15q24.1, nos genes *SEMA7A* e *CYP11A1* encontrada no paciente HBC 13.1, está relacionada à Síndromes Witteveen-Kolk ou Síndrome da microdeleção 15q24. Esta alteração foi reportada no estudo de Ben-Shachar e colaboradores (2009), em que após a triagem de 8200 indivíduos, a deleção foi encontrada em 20 indivíduos (14 crianças e 6 genitores). Os fenótipos incluíam atraso no desenvolvimento, retardo mental ou QI limítrofe na maioria das crianças e transtornos do espectro autista (6/14), atraso na fala, agressividade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e outros problemas comportamentais. Também houve uma grande proporção de crianças adotadas na amostra, além de morbidade psiquiátrica nos pais.

Com o Kit SALSA MLPA P343-C2 foi possível detectar uma alteração na região 22q13.33, no gene *SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3), comprometendo pelo menos os éxons 3, 14 e 21, onde estão as sondas do kit usado. Esta alteração também foi visualizada com o kit SALSA MLPA P245-B1, que tem sondas no gene *SHANK3* e uma sonda no gene *RABL2B* (ver Fig.6-B). Esta deleção está presente em heterozigose na paciente HBC 25.1. Este gene é um membro da família *SHANK*. As proteínas shank são proteínas de suporte multidose da densidade pós-sináptica, que conectam receptores de neurotransmissores, canais iônicos e outras proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina e às vias de sinalização acopladas à proteína G. As proteínas shank também desempenham um papel na formação de sinapses e na maturação das espinhas dendríticas e estão associadas à Síndrome de Phelan-McDermid (GeneReviews@NBK1198, 2019). Peixoto et al., 2017 relatou esta deleção como fator de risco para TEA e em outros estudos Han et al., 2013 e Waga, 2013 reportaram uma frequência deleção neste gene de 0,5 a 1% dos indivíduos com TEA.

Embora a patogenicidade de alguns dos nossos resultados já esteja bem esclarecida, a maioria dos resultados de MLPA precisam ser melhor refinados usando outras técnicas mais precisas, como o *array* CGH proposto no fluxo de atendimento e não realizado devido à limitação de tempo.

## Limitações do trabalho e pontos positivos

### Limitações

#### 1) Tamanho amostral - Alto índice de recusa

Inicialmente, tínhamos um levantamento de 168 crianças e adolescentes em atendimento no Ambulatório de Autismo, e nossa amostragem final foi de 65 crianças e adolescentes. Observamos um grande índice de recusa na participação da pesquisa devido à necessidade de coleta de sangue em outro local, sendo este o grande fator limitante. São crianças e adolescentes que possuem problemas de comportamento, e em nossas perspectivas futuras estamos planejando coleta de outros tipos de material biológico, no mesmo ambiente de funcionamento do ambulatório. Outro fator limitante foi a falta de expectativa no diagnóstico das crianças e adolescentes pelos seus genitores.

#### 2) Ausência de informações confiáveis no prontuário - dados omissos e faltantes

Em nosso levantamento de dados clínicos e demográficos observamos ausência de informações importantes no prontuário ou na entrevista com os pais durante a coleta. Isto impossibilitou uma análise mais robusta de nossos dados.

#### 3) Avaliação morfológica por meio de fotografias

Na avaliação morfológica para verificar a presença de dismorfismos tivemos muitas limitações na qualidade das fotos. São crianças e adolescentes que possuem problemas de comportamento e em alguns casos não conseguimos as fotos.

### Pontos positivos

Um dos pontos positivos da pesquisa foi possibilitar às crianças e adolescentes do Ambulatório de Autismo a realização dos testes genéticos, que não conseguiriam fazer devido ao alto custo. Além de uma pequena contribuição, com estes achados, na elucidação da etiologia do TEA nos indivíduos afetados.

Em nosso estudo, composto por 65 amostras de crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA, as comorbidades mais descritas foram: icterícia, pré-eclâmpsia, sofrimento fetal e prematuridade. O Ambulatório de Autismo está localizado em um hospital terciário, que possui diversas especialidades clínicas, sendo assim a nossa amostra pode

ter sofrido um viés de averiguação, que pode ter favorecido a incidência de comorbidades específicas, como por exemplo, uma maior frequência de associação com dismorfismos.

## 5. Conclusões

Em nosso estudo surgiram evidências de múltiplos fatores associados ao aparecimento do TEA, incluindo maior frequência de baixo peso de nascimento, prematuridade, pré-eclâmpsia e idade materna um pouco mais elevada. Além disso, surgiram evidências para um componente genético heterogêneo, incluindo em um paciente a Síndrome do X Frágil e em dois, a presença de microdeleções patogênicas.

O uso de dois kits de MLPA (SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA 343-C1) levou ao estabelecimento de apenas dois diagnósticos etiológicos e em dois outros pacientes, a resultados duvidosos, que precisariam ser melhor investigados por outros métodos (e.g., aCGH, PCR sensível à metilação). Consequentemente, a triagem inicial com MLPA não se mostraria economicamente vantajosa, quando comparada ao uso do aCGH como estratégia de investigação inicial.

### Perspectivas Futuras

Em nossas perspectivas futuras estão: ampliação do número amostral, realização do aCGH para os pacientes não síndrômicos, avaliação da possibilidade de coleta do DNA em amostras biológicas alternativas como saliva, associação dos dados genéticos com as informações clínicas mais detalhadas, utilizando as escalas de comportamento (alterações comportamentais, gravidade dos sintomas etc.).

## 6. Referências Eletrônicas e Bibliográficas

ADHYA D, SWARUP V, NAGY R, SHUM C, NOWOSIAD P, JOZWIK K., & MENDEZ, M. A. Atypical neurogenesis and excitatory-inhibitory progenitor generation in induced pluripotent stem cell (iPSC) from autistic individuals. *bioRxiv*, 349415. 2019.

AMIN SB, SMITH T, WANG H. Is neonatal jaundice associated with Autism Spectrum Disorders: a systematic review. *J Autism Dev Disord*. Nov;41(11):1455-63. doi: 10.1007/s10803-010-1169-6. 2011.

ANSEL A, ROSENZWEIG JP, ZISMAN, MELAMED M, GESUNDHEIT B. Variation in Gene Expression in Autism Spectrum Disorders: An Extensive Review of Transcriptomic Studies. *Front. Neurosci*. 10:601. doi: 10.3389/fnins.2016.00601, 2017.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition. Washington, DC: **American Psychiatric Association**. 1994.

ANGKUSTSIRI K, KRAKOWIAK P, MOGHADDAM B, WARDINSKY T, GARDNER J, KALAMKARIAN N, HERTZ-PICCIOTTO I, HANSEN RL. Minor physical anomalies in children with autism spectrum disorders. *Autism*. Nov;15(6):746-60. 2011.

ASHLEY DM, BONNIE M, MELINDA H, YING G, BRYAN WI, LAUREN M. HEAD Z, RN, KATIE B. Probability of an Autism Diagnosis by Gestational Age. *Newborn Infant Nurs Rev*. Dec;16(4):322-326, 2016.

BAILEY A, LE COUTEUR A, GOTTESMAN I, BOLTON P, SIMONOFF E, YUZDA E, RUTTER M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* Jan;25(1):63-77, 1995.

BAIO J, WIGGINS L, CHRISTENSEN DL, MAENNER MJ, DANIELS J, WARREN Z, KURZIUS-SPENCER M, ZAHORODNY W, ROBINSON ROSENBERG C, WHITE T, DURKIN MS, IMM P, NIKOLAOU L, YEARGIN-ALLSOPP M, LEE LC, HARRINGTON R, LOPEZ M, FITZGERALD RT, HEWITT A, PETTYGROVE S, CONSTANTINO JN, VEHORN A, SHENOUDA J, HALL-LANDE J, VAN NAARDEN BRAUN K, DOWLING NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries** / April 27, / 67(6);1–23. 2018

BASU SN, KOLLU R, BANERJEE-BASU S. AutDB: a gene reference resource for autism research. **Nucleic Acids Res.** Jan; 37: D832–6, 2009.

BASU, S. N.; KOLLU, R.; BANERJEE-BASU, S. AutDB: a gene reference resource for autism research. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl\_1, p. D832-D836, 2008.

BEN-SHACHAR S, LANPHER B, GERMAN JR, QASAYMEH M, POTOCKI L, NAGAMANI SC, FRANCO LM, MALPHRUS A, BOTTENFIELD GW, SPENCE JE, AMATO S, ROUSSEAU JA, MOGHADDAM B, SKINNER C, SKINNER SA, BERNES S, ARMSTRONG N, SHINAWI M, STANKIEWICZ P, PATEL A, CHEUNG SW, LUPSKI JR, BEAUDET AL, SAHOO T. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for, mental retardation, and psychiatric disorders. **J Med Genet.**;46 (6):382–388, 2009.

BETANCUR C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Res**; 1380:42-77, 2011.

BRADLEY SCHAEFER G. Clinical Genetic Aspects of ASD Spectrum Disorders. **Int. J. Mol. Sci.**; 17(2): 180, 2016.

BRIAN KL, CECILIA MRG, ÅSA B, CRAIG J., IGOR BURSTYN,2,5 HÅKAN KARLSSON AND CHRISTINA DALMAN. Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. **Brain, behavior, and immunity** 44: 100-105, 2015.

CAMPISTOL J, DÍEZ-JUAN M CALLEJÓN L, FERNANDEZ-DE MIGUEL, A, CASADO M, GARCIA CAZORLA A. ARTUCH,R. Inborn error metabolic screening in individuals with nonsyndromic autism spectrum disorders. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 58(8), 842–847. doi:10.1111/dmcn.13114, 2016.

CLARK SJ, STATHAM A, STIRZAKER C, MOLLOY PL, FROMMER M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Nat Protoc** 1(5):2353-64. 2006;

CLASSIFICAÇÃO DE TRANSTORNOS MENTAIS E DE COMPORTAMENTO - CID-10. Organização Mundial Saúde, editor. **Porto Alegre: Artes Médicas**, 1993.

CLIFFORD S, DISSANAYAKE C, BUI QM, HUGGINS R, TAYLOR AK, LOESCH DZ. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. **J Autism Dev Disord** .Apr;37(4):738-47, 2007.

CURRAN EA, O'KEEFFE GW, LOONEY AM, MOLONEY G, HEGARTY SV, MURRAY DM, KHASHAN AS, KENNY LC. Exposure to Hypertensive Disorders of Pregnancy Increases the Risk of Autism Spectrum Disorder in Affected Offspring. **Mol Neurobiol**. Jul;55(7):5557-5564, 2018.

DEVLIN B, SCHERER SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. **Curr Opin Genet Dev**. Jun;22(3):229-37, 2012.

DRISCOLL DJ, MILLER JL, SCHWARTZ S, et al. Prader-Willi Syndrome. 1998 Oct 6 [Updated 2017 Dec 14]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1330/>, último acesso em fev/2019).

DUARTE, Regina Célia Beltrão. Deficiência intelectual na criança. *Residência Pediátrica* 2018;8(supl 1):17-25.

ELLARD S, BAPLE EL, OWENS M, ECCLES DM, ABBS S, DEANS Z C, & MCMULLAN D J. ACGS best practice guidelines for variant classification 2017. **Association for Clinical Genetics Science**, 2017.

FEUK L, CARSON AR, SCHERER SW. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet Feb**; 7(2):85–97, 2006.

FREITAG CM, STAAL W, KLAUCK SM, DUKETIS E, WALTERS R. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. **Eur Child Adolesc Psychiatry Mar**;19(3):169-78, 2010.

FU YH1, KUHL DP, PIZZUTI A, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, RICHARDS S, VERKERK AJ, HOLDEN JJ, FENWICK RG JR, WARREN ST, ET AL. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell. Dec 20**;67(6):1047-58, 1991.

GARBER, K. Autism's case may reside in abnormalities at the synapse. *Science* 13 Jul:Vol. 317, **Issue 5835**, pp. 190-191, 2007.

A K GEDEON, M MEINÄNEN, L C ADÈS, H KÄÄRIÄINEN, J GÉCZ, E BAKER, G R SUTHERLAND, AND J C MULLEY. Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: identification of a gene near FRAXE. *Am J Hum Genet. Apr*;56(4):907-14, 1995

GESCHWIND, DH, 2009. Advances in autism. **Annu. Rev. Med.** 60, 367–380.

GHASEMI F S, VAMEGHI R, KARIMINEJAD R, DARVISH H, BANIHASHEMI S, FIROUZKOUHI MOGHADDAM M, JAMALI P, FARBOD MTH, DEGHANI H, RAEISOON MR, NAROOIE-NEJAD M, JAMSHIDI J, TAFAKHORI A, SADABADI S, BEHJATI F. Analysis of Copy Number Variations in Patients with Autism Using Cytogenetic and MLPA Techniques: Report of 16p13.1p13.3 and 10q26.3 Duplications. **Int J Mol Cell Med Fall**;5(4):236-245, 2016.

GIRIRAJAN S, EICHLER EE. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. **Hum Mol Genet.** Oct 15; 19(R2): R176–R187. 2010

HADJKACEM I, AYADI H, TURKI M, YAICH S, KHEMEKHEM K, WALHA A, CHERIF L, MOALLA Y, GHRIBI F. Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. **J Pediatr (Rio J).** Nov - Dec;92(6):595-601, 2016.

HALLMAYER J, CLEVELAND S, TORRES A, PHILLIPS J, COHEN B, TORIGOE T, MILLER J, FEDELE A, COLLINS J, SMITH K, LOTSPEICH L, CROEN LA, OZONOFF S, LAJONCHERE C, GREYER JK, RISCH N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. **Arch Gen Psychiatry.** Nov;68(11):1095-1102, 2011.

HAN K, HOLDER JL JR, SCHAAF CP, LU H, CHEN H, KANG H, TANG J, WU Z, HAO S, CHEUNG SW, YU P, SUN H, BREMAN AM, PATEL A, LU HC, ZOGHBI HY. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. **Nature.**;503(7474):72–7. 2013

HATTON DD, SIDERIS J, SKINNER M, MANKOWSKI J, BAILEY DB JR, ROBERTS J, MIRRETT P. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. **Am J Med Genet A.** Sep 1;140A(17):1804-13, 2006.

HERBERT R. Confidence Interval Calculator (2013). Disponível em (<https://www.pedro.org.au/portuguese/downloads/confidence-interval-calculator/último-acesso-em-fev/2019>)

JAKOBSSON M, SCHOLZ SW, SCHEET P, GIBBS JR, VANLIERE JM, FUNG HC, SZPIECH ZA, DEGNAN JH, WANG K, GUERREIRO R, BRAS JM, SCHYMICK JC, HERNANDEZ DG, TRAYNOR BJ, SIMON-SANCHEZ J, MATARIN M, BRITTON A, VAN DE LEEMPUT J, RAFFERTY I, BUCAN M, CANN HM, HARDY JA,

ROSENBERG NA, SINGLETON AB. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. **Nature** Feb 21; 451: 998–1003, 2008.

JEHEE FS, TAKAMORI JT, MEDEIROS PF, PORDEUS AC, LATINI FR, BERTOLA DR, KIM CA, PASSOS-BUENO MR. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet*. Jul-Aug;54(4):e425-32, 2011.

KAMEN CL, ZEVY DL, WARD JM, BISHNOI IR, KAVALIERS M, OSSENKOPP KP. Systemic Treatment with the Enteric Bacterial Fermentation Product, Propionic Acid, Reduces Acoustic Startle Response Magnitude in Rats in a Dose-Dependent Fashion: Contribution to a Rodent Model of ASD. **Neurotoxicity research**, v. 35, n. 2, p. 353-359, 2019.

KOGAN MD, VLADUTIU CJ, SCHIEVE LA, GHANDOUR RM, BLUMBERG SJ, ZABLOTSKY B, PERRIN JM, SHATTUCK P, KUHLTHAU KA, HARWOOD RL, LU MC. The Prevalence of Parent-Reported Autism Spectrum Disorder Among US Children. **Pediatrics**. 2018 Dec;142(6). pii: e20174161. doi: 10.1542/peds.2017

KUO H-Y AND LIU F-C. Molecular Pathology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder-Like Phenotypes Using Rodent Models. *Front. Cell. Neurosci*. 12:422. doi: 10.3389/fncel.2018.00422, 2018

SEALEY LA, HUGHES BW, SRISKANDA A N, GUEST J R, GIBSON AD, JOHNSON-WILLIAMS, L, BAGASRA, O. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environment international**, 88, 288-298. 2016

LATHE R. Fragile X and autism. **Autism** Mar;13(2):194-7. 2009

LAURITSEN MB. Autism spectrum disorders. **Eur Child Adolesc Psychiatry**. Feb;22 Suppl 1:S37-42, 2013.

LEBLOND CS, CLIQUET F, CARTON C, HUGUET G, MATHIEU A, KERGROHEN T, BURATTI J, LEMIÈRE N, CUISSET L, BIENVENU T, BOLAND A, DELEUZE JF, STORA T, BISKUPSTOE R, HALLING J, ANDORSDÓTTIR G, BILLSTEDT E, GILLBERG C, BOURGERON T. Both rare and common genetic variants contribute to autism in the Faroe Islands. **NPJ genomic medicine**, v. 4, n. 1, p. 1, 2019.

LICHTENSTEIN P, CARLSTRÖM E, RÅSTAM M, GILLBERG C, ANCKARSÄTER H. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. **Am. J. Psychiatry** 167 (3), 1357–1363, 2010.

LINTAS, C. Linking genetics to epigenetics: The role of folate and folate-related pathways in neurodevelopmental disorders. **Clinical genetics**, v. 95, n. 2, p. 241-252, 2019.

LOESCH DZ, BUI MQ, HAMMERSLEY E, SCHNEIDER A, STOREY E, STIMPSON P, BURGESS T, FRANCIS D, SLATER H, TASSONE F, HAGERMAN RJ, HESSL D. Psychological status in female carriers of premutation FMR1 allele showing a complex relationship with the size of CGG expansion. **Clin Genet**. Feb;87(2):173-8, 2015.

LONG M, GHISARI M, KJELDSSEN L, WIELSØE M, NØRGAARD-PEDERSEN B, MORTENSEN EL, ABDALLAH MW, BONEFELD-JØRGENSEN EC. Autism spectrum disorders, endocrine disrupting compounds, and heavy metals in amniotic fluid: a case-control study. **Molecular autism**, v. 10, n. 1, p. 1, 2019.

LOZADA LE, NYLUND CM, GORMAN GH, HISLE-GORMAN E, ERDIE-LALENA CR, KUEHN D. Association of Autism Spectrum Disorders With Neonatal Hyperbilirubinemia. **Glob Pediatr Health**. Jul 21; 2:2333794X15596518, 2015.

MAIA FA. Transtorno do espectro do autismo e idade dos genitores: estudo de caso-controlado no Brasil. **Cad. Saúde Pública** 2018; 34(8).

MAIMBURG RD, VAETH M, SCHENDEL DE, BECH BH, OLSEN J, THORSEN P. Neonatal jaundice: a risk factor for infantile autism? **Pediatr Perinat Epidemiol.** Nov;22(6):562-8, 2008.

MANN JR, MCDERMOTT S, BAO H, HARDIN J, GREGG A. Pre-eclampsia, birth weight, and autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord.** May;40(5):548-54, 2010.

MANOUILENKO I, ERIKSSON JM, HUMBLE MB, BEJEROT S. Minor physical anomalies in adults with autism spectrum disorder and healthy controls. *Autism research and treatment*, v. 2014, 2014.

MCGRATH J, EL-SAAD O, GRIM V, CARDY S, CHAPPLE B, CHANT D, LIEBERMAN D, MOWRY B. Minor physical anomalies and quantitative measures of the head and face in patients with psychosis. **Arch Gen Psychiatry.** May; 59(5):458-64. 2002.

MCINNES LA1, NAKAMINE A, PILORGE M, BRANDT T, JIMÉNEZ GONZÁLEZ P, FALLAS M, MANGHI ER, EDELMANN L, GLESSNER J, HAKONARSON H, BETANCUR C, BUXBAUM JD. A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region. **Mol Autism.** Mar 19;1(1):5. 2010

MEADOR, K. J. Fetal Valproate Exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **JAMA network open**, v. 2, n. 1, p. e186603-e186603, 2019

MICHELSON DJ, SHEVELL MI, SHERR EH, MOESCHLER JB, GROPMAN AL, ASHWAL S. Evidence report: genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the quality standards Subcommittee of the American Academy of neurology and the practice Committee of the child neurology Society. **Neurology**;77(17):1629–35, 2011

MILES JH. Autism spectrum disorders- a genetics review. **Genet Med.** Apr;13(4):278-94, 2011.

MILLER DT, ADAM MP, ARADHYA S, BIESECKER LG, BROTHMAN AR, CARTER NP, CHURCH DM, CROLLA JA, EICHLER EE, EPSTEIN CJ, FAUCETT WA, FEUK L, FRIEDMAN JM, HAMOSH A, JACKSON L, KAMINSKY EB, KOK K, KRANTZ ID, KUHN RM, LEE C, OSTELL JM, ROSENBERG C, SCHERER SW, SPINNER NB, STAVROPOULOS DJ, TEPPERBERG JH, THORLAND EC, VERMEESCH JR, WAGGONER DJ, WATSON MS, MARTIN CL, LEDBETTER DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet.** May 14;86(5):749-64. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.2010.

MOESCHLER, J. B. Neurodevelopmental Disabilities: Global Developmental Delay, Intellectual Disability, and Autism. In: **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics.** Academic Press, 2019. p. 61-79.

MOREIRA DP, GRIESI-OLIVEIRA K, BOSSOLANI-MARTINS AL, LOURENÇO NC, TAKAHASHI VN, DA ROCHA KM, MOREIRA ES, VADASZ E, MEIRA JG, BERTOLA D, O'HALLORAN E, MAGALHÃES TR, FETT-CONTE AC, PASSOS-BUENO MR. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. **PLoS One.** Sep 25;9(9):e107705, 2014.

MRC-HOLLAND b.v (Disponível em <http://www.mrc-holland.com>, último acesso em 08/02/2019)

MUHLE R, TRENTACOSTE SV, RAPIN I. The Genetics of Autism. **Pediatrics.** May;113(5):e472-86, 2004.

NEGGERS, Y. H. Increasing prevalence, changes in diagnostic criteria, and nutritional risk factors for autism spectrum disorders. **ISRN nutrition**, v. 2014, 2014.

OBERLÉ I, ROUSSEAU F, HEITZ D, KRETZ C, DEVYS D, HANAUER A, BOUÉ J, BERTHEAS MF, MANDEL JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and

abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. May 24;252(5009):1097-102, 1991.

PATTERSON K, MOLLOY L, QU W, CLARK S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. **J. Vis. Exp.** 2011; (56): 3170.

PEIXOTO S, MELO JB, FERRÃO J, PIRES LM, LAVOURA N, PINTO M, OLIVEIRA G, CARREIRA IM. MLPA analysis in a cohort of patients with autism. **Molecular Cytogenetics** (2017) 10:2.

PHELAN K, ROGERS RC, BOCCUTO L. Phelan-McDermid Syndrome. 2005 May 11 [Updated 2018 Jun 7]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1198/>último acesso em fev/2019).

REDDY, K. S. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. **BMC medical genetics**, v. 6, n. 1, p. 3, 2005.

ROL de Procedimentos e Eventos da Agência Nacional de Saúde Suplementar, ANEXO II. DIRETRIZES DE UTILIZAÇÃO. PARA COBERTURA DE PROCEDIMENTOS NA SAÚDE SUPLEMENTAR. ROL DE PROCEDIMENTOS. Agência Nacional de Saúde 2018, p. 135

SANDIN S, HULTMAN CM, KOLEVZON A, GROSS R, MACCABE JH, REICHENBERG A. Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. May;51(5):477-486, 2012.

SANDIN S, LICHTENSTEIN P, KUJA-HALKOLA R, HULTMAN C, LARSSON H, REICHENBERG A. The Heritability of Autism Spectrum Disorder. **JAMA**. 2017;318(12):1182-1184

SCHAEFER GB, MENDELSON NJ. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. **Genet Med.** May;15(5):399-407, 2013

SCHAEFER GB, MENDELSON NJ. Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. **Genet Med** Jan;10(1):4-12, 2008.

SCHERER SW, DAWSON G. Risk factors for autism: translating genomic discoveries into diagnostics. **Hum. Genet.** Jul;130(1):123-48, 2011.

SCHOPLER E, REICHLER R, ROCHEN RENNER B. The childhood autism rating scale. **Western Psychological Services**; 1988.

SCHOUTEN JP, MCELGUNN CJ, WAAIJER R, ZWIJNENBURG D, DIEPVENS F, PALS G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res** Jun 15;30(12):e57, 2002.

SGRITTA M, DOOLING SW, BUFFINGTON SA, MOMIN EN, FRANCIS MB, BRITTON RA, COSTA-MATTIOLI M. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder. **Neuron**, v. 101, n. 2, p. 246-259. e6, 2019.

SHAFFER LG, BEJJANI BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. **Human Reproduction Update** May-Jun;10(3):221-6, 2004

SHAW JC, LUPSK JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet.** Apr 1;13 Spec No 1:R57-64, 2004.

SHEN Y, DIES KA, HOLM IA, BRIDGEMOHAN C, SOBEIH MM, CARONNA EB, MILLER KJ, FRAZIER JA, SILVERSTEIN I, PICKER J, WEISSMAN L, RAFFALLI P, JESTE S, DEMMER LA, PETERS HK, BREWSTER SJ, KOWALCZYK SJ, ROSEN-SHEIDLEY B, MCGOWAN C, DUDA AW 3RD, LINCOLN SA, LOWE KR,

SCHONWALD A, ROBBINS M, HISAMA F, WOLFF R, BECKER R, NASIR R, URION DK, MILUNSKY JM, RAPPAPORT L, GUSELLA JF, WALSH CA, WU BL, MILLER DT; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. April; 125(4): e727–e735, 2010.

SHEVELL MI, MAJNEMER A, ROSENBAUM P, ABRAHAMOWICZ M. Etiologic yield of autistic spectrum disorders: a prospective study. *J Child Neurol*. Jul;16(7):509-12, 2001.

SMITH, JOSEPH J. KING, PAUL R. WEST, MICHAEL A. LUDWIG, ELIZABETH L.R. DONLEY, ROBERT E. BURRIER, AND DAVID G. AMARAL. Amino Acid Dysregulation Metatypes: Potential Biomarkers for Diagnosis and Individualized Treatment for Subtypes of Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry* February 15,; 85:345–354, 2019.

SRIVASTAVA AK, SCHWARTZ CE. Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders: Causal Genes and Molecular Mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. Oct;46 Pt 2:161-74, 2014.

SUDHA, V. P.; VIJAYA, M. S. Machine Learning-Based Model for Identification of Syndromic Autism Spectrum Disorder. In: **Integrated Intelligent Computing, Communication and Security**. Springer, Singapore, 2019. p. 141-148.

TAMMIMIES K, MARSHALL CR, WALKER S, KAUR G, THIRUVAHINDRAPURAM B, LIONEL AC, YUEN RK, UDDIN M, ROBERTS W, WEKSBERG R, WOODBURY-SMITH M, ZWAIGENBAUM L, ANAGNOSTOU E, WANG Z, WEI J, HOWE JL, GAZZELLONE MJ, LAU L, SUNG WW, WHITTEN K, VARDY C, CROSBIE V, TSANG B, D'ABATE L, TONG WW, LUSCOMBE S, DOYLE T, CARTER MT, SZATMARI P, STUCKLESS S, MERICO D, STAVROPOULOS DJ, SCHERER SW, FERNANDEZ BA. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 2015 Sep 1;314(9):895-903. doi: 10.1001/jama.2015.10078.

TARLETON J, KENNESON A, TAYLOR AK, CRANDALL K, FLETCHER R, CASEY R, HART PS, HATTON D, FISCH G, WARREN ST. A single base alteration in the CGG repeat region of FMR1: possible effects on gene expression and phenotype. **J Med Genet.** 2002 Mar;39(3):196-200.

TARTAGLIONE AM, SCHIAVI S, CALAMANDREI G, TREZZA V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, 2019.

TICK B, BOLTON P, HAPPÉ F, RUTTER M, RIJSDIJK F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 57, n. 5, p. 585-595, 2016.

TREMBLAY, MARTINE W., JIANG, Y-H. DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 151-166, 2019.

UCHINO S, WAGA C. SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. **Brain Dev.**;35(2):106–10. 2013

VERKERK AJ, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, FU YH, KUHL DP, PIZZUTI A, REINER O, RICHARDS S, VICTORIA MF, ZHANG FP, ET AL. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell** May 31;65(5):905-14, 1991.

VIANNA, G. S. Contribuição das deleções em 22q11.2 para os fenótipos Dificuldade de Aprendizagem da Matemática, Dificuldade de Aprendizagem da Matemática e escrita e Distúrbios de Fonação. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VIANNA P, GOMES JDA, BOQUETT JA, FRAGA LR, SCHUCH JB, VIANNA FSL, SCHULER-FACCINI L. Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects. **Neuroimmunomodulation**, p. 1-8, 2019.

WALKER CK, KRAKOWIAK P, BAKER A, HANSEN RL, OZONOFF S, HERTZ-PICCIOTTO I. Preeclampsia, Placental Insufficiency and Autism Spectrum Disorder or Developmental Delay. **JAMA Pediatr.** Feb;169(2):154-62, 2015.

WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK B, NOWAKOWSKA BA. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder-current evidence in the field. *J Appl Genet.* Feb;60(1):37-47. doi: 10.1007/s13353-018-00480-w. **Epub** 2019 Jan 10. Review. PubMed PMID: 30627967, 2019.

WONG VC, FUNG CK, WONG PT. Use of dysmorphology for subgroup classification on autism spectrum disorder in Chinese children. **J Autism Dev Disord.** Jan;44(1):9-18, 2014.

ZABLOTSKY, B., BLACK, L.I., MAENNER, M.J., SCHIEVE, L.A., BLUMBERG, S.J., Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 National Health Interview Survey. **Natl. Health Stat. Rep.** 87, 1–21, 2015.

ZHANG XC, SHU LQ, ZHAO XS, LI XK. Autism spectrum disorders: autistic phenotypes and complicated mechanisms. **World J Pediatr.** 2019 Jan 3. doi:10.1007/s12519-018-0210-2.

ZHOU Y, LAW HY, BOEHM CD, YOON CS, CUTTING GR, NG IS, CHONG SS. Robust fragile X (CGG)<sub>n</sub> genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. **J Med Genet.** 2004 Apr;41(4):e45.

ZHOU Y, LUM JM, YEO GH, KIING J, TAY SK, CHONG SS. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. **Clin Chem.** 2006 Aug;52(8):1492-500.

ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: Advances in diagnosis and evaluation. **BMJ** 2018, 361, k1674

## 7. Anexo

## ANEXO I - Parecer nº 2.132.120

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ALTERAÇÕES NAS CNVs EM PACIENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) EM UMA AMOSTRAGEM

**Pesquisador:** Janaina Matos Moreira

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 67953817.6.0000.5149

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

**Patrocinador Principal:** INSTITUTO HERMES PARDINI S/A

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.132.120

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de resposta à diligência do estudo de caráter transversal para avaliação genética de crianças e adolescentes com diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e de seus pais, com o objetivo de caracterizar as alterações genéticas na amostra. O TEA compreende um grande número de síndromes que possuem sintomas semelhantes. Atualmente o diagnóstico é clínico através da observação direta do comportamento e entrevista com os pais.

Ainda não existem exames específicos para o diagnóstico, apenas exames para a exclusão de outras patologias, como exames de imagem, exames genéticos de baixa resolução, exames para distúrbios de metabolismo e alguns testes sorológicos para doenças infecciosas que acometem o cérebro. Estudo de associação genômica entre as populações vem demonstrando grandes resultados para identificação de uma causa genética. Deste modo a análise de alterações genéticas nas CNVs através de uma abordagem investigativa pode auxiliar na

elaboração de um fluxo para um diagnóstico mais assertivo e acessível para a população, portanto facilitará a aquisição de serviços necessários para o paciente e sua família. Os critérios de inclusão são:- Diagnóstico confirmado de TEA; - Consentimento em participar da pesquisa.

Os critérios de exclusão compreendem:- Alteração na triagem metabólica para erros inatos do

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2ª Ad S/A 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Protocolo: 2.132.120

metabolismo; - Diagnóstico de TEA com alta probabilidade de etiologia não genética, infecção congênita, hipóxia neonatal grave e uso de drogas teratogênicas na gravidez.

Os participantes deste projeto são pacientes com diagnóstico clínico de Transtorno do Espectro Autista em atendimento médico no Ambulatório de Saúde Mental do Hospital Borges da Costa. Os pacientes possuem de 2 a 18 anos. A amostra dos pais será coleta de sangue utilizada para confirmação da origem da alteração genética. A coleta das crianças compreende uma avaliação clínica e laboratorial. A avaliação clínica consistirá em uma avaliação desenvolvimental, comportamental, cognitiva e dismorfológica. A avaliação desenvolvimental será composta por testes para avaliar o desenvolvimento motor (M-ABC), de linguagem (Token Test, Perfil comunicativo funcional, Extensão Média do Enunciado,

ABFW, Teste de Vocabulário por Imagem Peabody.), aprendizagem de leitura (Prova de consciência fonológica, Prova de Leitura de Palavras e Pseudopalavras, Prova de Compreensão de Leitura, Prova de Escrita sob Ditado de Palavras e Pseudopalavras, Prova de Escrita Semidirigida de Textos) e de vida adaptativa (Vineland). A avaliação comportamental inclui os questionários Aberrant Behavior Checklist (ABC), SNAP-IV e Social Responsiveness Scale 2 (SRS-2). A avaliação cognitiva será composta por instrumentos de avaliação do desenvolvimento intelectual, a depender da idade e do desenvolvimento cognitivo do participante (ex: Teste de Columbia, Matrizes Coloridas de Raven e Matrizes Progressivas de Raven). A avaliação dismorfológica incluirá avaliação genética clínica padrão e avaliação quantitativa de anomalias físicas menores (McGrath et

al., 2002). Os participantes serão ainda examinados para sinais neurológicos leves, segundo a Escala de Sinais Neurológicos Leves de Heidelberg. A avaliação laboratorial consistirá na obtenção das amostras de sangue periférico para extração de DNA, realização de exames genéticos e análise de alterações genéticas nas CNVs. A análise laboratorial genética dos pacientes será constituída dos seguintes exames: Cariótipo com bandeamento G, PCR para expansão no gene FMR1, MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), Transformação do DNA para Síndromes de Prader Willi e Angelman com a técnica de MS-HRM e Hibridização Genômica Comparativa (aCGH). As entrevistas serão realizadas em consultórios de Saúde Mental do Hospital Borges da Costa, onde os pacientes que preencham aos critérios de inclusão do estudo já estarão em atendimento por uma equipe multidisciplinar. Neste local também serão explicados todos os procedimentos da pesquisa, esclarecidas eventuais dúvidas e obtido o consentimento do paciente e de seu cuidador por meio da assinatura do TCLE e TALE.

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Ad S/1 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4582

E-mail: cosp@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.132.120

Os pacientes e os responsáveis que aceitarem participar da pesquisa serão submetidos à(s) entrevista(s) psiquiátrica(s) e a consulta com geneticista para aconselhamento genético que serão realizadas por profissional devidamente capacitado. Essa(s) entrevista(s) e a consulta serão em dias alternados e terão no máximo duas horas de duração. O retorno para entrega do resultado seguirá um fluxo de acordo com a análise dos resultados genéticos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os pesquisadores declaram:

**Objetivo geral:**

Realizar testes genéticos para avaliar as alterações na CNVs em uma amostragem mineira diagnosticada clinicamente com TEA (Transtorno do Espectro Autista).

**Objetivos específicos:**

- Caracterizar os participantes com TEA fenotipicamente em termos desenvolvimentais, comportamentais, cognitivos e dismorfológicos.
- Avaliar a presença de variação no número de cópias (CNVs) dos genes relacionados com a via sináptica e a neurotransmissão. Em casos alterados, validar os achados por sequenciamento sanger ou array-CGH;
- Comparar os achados com bancos de dados de indivíduos normais;
- Avaliar a presença de possíveis alterações também nos progenitores do afetado, para verificar se foram herdadas ou se são mutações de novo;
- Analisar de que modo às características fenotípicas podem influenciar a estratégia diagnóstica genéticomolecular.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foram descritos:

Riscos: Não haverá qualquer interferência no tratamento dos pacientes. O único procedimento invasivo será uma coleta de sangue total em tubos estéreis com vácuo, com seringas e agulhas descartáveis. A coleta será realizada segundo as normas de assepsia. Este procedimento será executado com a máxima segurança possível e por pessoa experiente. Os riscos para o paciente são os habituais de coleta de sangue, explicitados no termo de consentimento, e o participante será indagado previamente quanto a possíveis problemas de coagulação. A coleta ocorrerá no momento em que exames laboratoriais de rotina são realizados nos pacientes, e nos controles no mesmo dia da entrevista. A pesquisa também poderá ocasionar desconforto mínimo relacionado à

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4502 E-mail: cosp@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.132.120

entrevista ou durante a consulta.

**Benefícios:** Poderá trazer benefício direto, uma vez que, constatado sintoma ou problema psiquiátrico clinicamente relevante, com o consentimento do paciente, o médico responsável pela assistência será informado para que sejam tomadas as condutas apropriadas. Há benefício indireto também pelo fato de informações obtidas contribuírem para melhor compreensão dos transtornos psiquiátricos presentes na população do estudo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa pertinente, necessária e adequada para a área de conhecimento, bem definida do ponto de vista metodológico, exequível, com cronograma compatível. Todas as adequações solicitadas foram realizadas no projeto, TCLE e TALE.

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

Foram apresentados:

- Projeto no formato da plataforma Brasil e detalhado
- Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pela pesquisadora responsável e diretor da Faculdade de Medicina da UFMG
- Declaração da Gerência de Ensino e Pesquisa (GEPE) do HC/UFMG de recepção do projeto para registro e avaliação
- Termo de consentimento livre e esclarecido para os pais/responsáveis de crianças de 2 a 6 anos
- Termo de assentimento livre e esclarecido para crianças de 7 a 12 anos
- Termo de assentimento livre e esclarecido para crianças de 13 a 18 anos
- Termo de consentimento livre e esclarecido para os pais/responsáveis de adolescentes
- Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de sangue dos pais
- Parecer consubstanciado com anuência do projeto pelo Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina da UFMG
- Parecer consubstanciado com anuência do projeto pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG
- Parecer com anuência do projeto assinado pela coordenadora do Serviço de Psiquiatria do Ambulatório Borges da Costa do HC-UFMG
- Autorização da chefe da Unidade de Gestão do Atendimento Ambulatorial do HC-UFMG para realização da pesquisa
- Termo de parceria firmado com o Instituto Hermes Pardini de apoio financeiro e custeio dos exames a serem realizados na pesquisa
- Projeto, TCLE e TALE com as devidas adequações

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Ad S1 3005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4552

E-mail: cosp@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.132.120

- Carta resposta ao COEP

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

Sou, SMU deste Comitê, pela aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_872849.pdf	12/06/2017 11:02:55		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_.docx	12/06/2017 10:57:55	Jansina Matos Moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TCLE_corrigidos.doc	12/06/2017 10:57:27	Jansina Matos Moreira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Assinatura_diretor.pdf	03/05/2017 14:34:48	Jansina Matos Moreira	Aceito
Outros	Comprovante_recebimento_DEPE.pdf	03/05/2017 14:34:00	Jansina Matos Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_servico_psiquiatria_CLM.pdf	03/05/2017 14:32:08	Jansina Matos Moreira	Aceito
Outros	Parecer_Departamento_SM_parte2.pdf	03/05/2017 14:31:15	Jansina Matos Moreira	Aceito
Outros	Parecer_Departamento_SM_parte1.pdf	03/05/2017 14:30:36	Jansina Matos Moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_Chefia_Bias_Fortes.pdf	03/05/2017 14:29:52	Jansina Matos Moreira	Aceito
Outros	DEPARTAMENTO_PEDIATRIA.pdf	24/02/2017 09:53:41	Jansina Matos Moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TERMOS_CONSENTIMENTO.pdf	24/02/2017 09:51:39	Jansina Matos Moreira	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.132.120

Ausência	TERMOS_CONSENTIMENTO.pdf	24/02/2017 09:51:39	Jansina Matos Moreira	Aceito
Declaração do Patrocinador	Contrato_Pardini.pdf	24/02/2017 09:51:26	Jansina Matos Moreira	Aceito
Outros	679638176aprovacaoassinada.pdf	22/06/2017 11:01:10	Vivian Resende	Aceito
Outros	679638176parecerassinado.pdf	22/06/2017 11:01:17	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 22 de Junho de 2017

---

Assinado por:  
Vivian Resende  
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Ad S/N 3005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4582

E-mail: coop@prpq.ufmg.br

## ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE (Para coleta de sangue dos pais) 1ª e 2ª VIA - CAAE:67953817.6.0000.5149

**Introdução:** Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada: "Caracterização genômica de alterações nas CNVs (regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) em uma amostragem mineira". Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Você e seu filho(a) serão informados verbalmente e de forma compreensiva sobre a pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e direito de vocês saírem do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Entretanto em caso de dano durante a coleta, profissionais treinados providenciarão os atendimentos necessários. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

**Objetivo:** Realizar testes genéticos para avaliar as alterações no CNVs (regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em uma amostragem mineira diagnosticada clinicamente com TEA (transtorno do espectro autista) e estabelecer através dos achados uma associação com a clínica e propor um fluxo de atendimento para exames genéticos

**Resumo:** O transtorno do espectro autista compreende um grande número de síndromes que possuem sintomatologias semelhantes. Atualmente o diagnóstico é clínico através de observação direta do comportamento e entrevista com os pais. Ainda não há exames específicos para o diagnóstico, apenas exames para exclusão de outras doenças, como exames de imagem, exames genéticos de baixa resolução, exames para distúrbios de metabolismo e alguns testes sorológicos para doenças infecciosas que acomete o cérebro. A análise de DNA vem apresentando bons resultados e surge como uma alternativa para investigar possíveis alterações genéticas. Este estudo pretende fazer a análise genômica e investigar possíveis associações com clínica do participante.

**Procedimentos:** Este estudo irá incluir avaliações do desenvolvimento e comportamento das crianças/adolescentes. Além disso, será programada uma coleta de sangue periférico por profissional habilitado nas Unidades do Laboratório Hermes Pardini por profissionais treinados para este procedimento. Este procedimento pode, ocasionalmente, causar dor no local, formação de hematoma, e raramente, infecção, lesão de uma artéria ou nervo. Serão utilizadas medidas de segurança para que os riscos e as complicações decorrentes dessa atividade sejam mínimos. Em caso de qualquer complicação, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Dra. Janaina Matos Moreira no telefone 99978-6104 e a Bióloga Michele da Silva Gonçalves no telefone 984440966.

A pesquisa ocorre durante o acompanhamento do tratamento no ambulatório, aproveitando a consulta mensal do paciente agendada periodicamente.

**Critérios de Inclusão:** Diagnóstico clínico prévio de transtorno do espectro autista.

**Benefícios:** A pesquisa pretende através da análise do DNA identificar e avaliar as alterações genéticas relacionadas com o transtorno do espectro autista. Tais alterações são decorrentes de mutações que ocorrem no DNA e podem ser herdadas ou adquiridas. Esta pesquisa tem como objetivo correlacionar estas características ao neurodesenvolvimento do indivíduo.

**Confidencialidade:** Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Rubrica do responsável:

Rubrica do pesquisador:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Os dados gerados da pesquisa como fotos, ficha de cadastro e o material genético ficaram armazenados durante a execução da pesquisa, cerca de 2 a 5 anos, sob responsabilidade dos pesquisadores. Após este período o material será destruído.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Vocês poderão parar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

**Compensação:** Vocês não receberão qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

**Emergência / contato com a Comissão de Ética:** Durante o estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar: Michele da Silva Gonçalves - Pesquisadora – (31)984440966 [michele.una@gmail.com](mailto:michele.una@gmail.com) ou Profa. Dra. Janaina Matos Moreira – Orientadora da Pesquisa - (31) 99978-6104 [janainamoreira@terra.com.br](mailto:janainamoreira@terra.com.br), Endereço: Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais: Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592 [coep@ppmq.ufmg.br](mailto:coep@ppmq.ufmg.br)

**Consentimento:** Li e entendi as informações fornecidas. Tivemos a oportunidade de fazer perguntas e todas as dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim em duas vias, sendo uma para a pesquisa e a outra para o participante indicando que quero participar do estudo, até que decida o contrário.

Estou ciente de que:

1. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e não interferirá no atendimento ou tratamento médico;
2. Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
3. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
  - ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa e manterei meu telefone de contato sempre atualizado.
  - ( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
4. Caso tenham sido tiradas fotografias:
  - ( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
  - ( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
  - ( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do participante \_\_\_\_\_

Assinatura dos pais \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE**  
(Para os pais ou responsáveis) 1ª e 2ª VIA - CAAE:67953817.6.0000.5149

**Introdução:** Seu(a) filho(a) estão sendo convidados(as) a participar da pesquisa intitulada: " Caracterização genômica de alterações nas CNVs ( regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) em uma amostragem mineira". Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Você e seu filho(a) serão informados verbalmente e de forma compreensiva sobre a pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e direito de vocês saírem do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Entretanto em caso de dano durante a coleta, profissionais treinados providenciarão os atendimentos necessários. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

**Objetivo:** Realizar testes genéticos para avaliar as alterações no CNVs (regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em uma amostragem mineira diagnosticada clinicamente com TEA (transtorno do espectro autista ) e estabelecer através dos achados uma associação com a clínica e propor um fluxo de atendimento para exames genéticos

**Resumo:** O transtorno do espectro autista compreende um grande número de síndromes que possuem sintomatologias semelhantes. Atualmente o diagnóstico é clínico através de observação direta do comportamento e entrevista com os pais. Ainda não há exames específicos para o diagnóstico, apenas exames para exclusão de outras doenças, como exames de imagem, exames genéticos de baixa resolução, exames para distúrbios de metabolismo e alguns testes sorológicos para doenças infecciosas que acomete o cérebro. A análise de DNA vem apresentando bons resultados e surge como uma alternativa para investigar possíveis alterações genéticas. Este estudo pretende fazer a análise genômica e investigar possíveis associações com clínica do participante.

**Procedimentos:** Este estudo irá incluir avaliações do desenvolvimento e comportamento das crianças ou do adolescentes. Estas avaliações são teste de raciocínio, lógica e coordenação motora para observar alguma dificuldade na execução. Já avaliação dismorfológica examinará alguma alteração física para investigação médica. Além disso, será programada uma coleta de sangue periférico por profissional habilitado da criança ou do adolescente nas Unidades do Laboratório Hemies Pardini por profissionais treinados para este procedimento. Este procedimento pode, ocasionalmente, causar dor no local, formação de hematoma, e raramente, infecção, lesão de uma artéria ou nervo. Serão utilizadas medidas de segurança para que os riscos e as complicações decorrentes dessa atividade sejam mínimos. Em caso de qualquer complicação, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Dra. Janaina Matos Moreira no telefone 99978-6104 e a Bióloga Michele da Silva Gonçalves no telefone 984440966.

A pesquisa ocorre durante o acompanhamento do tratamento no ambulatório, aproveitando a consulta mensal do paciente agendada periodicamente.

**Critérios de Inclusão:** Diagnóstico clínico prévio de transtorno do espectro autista.

**Benefícios:** A pesquisa pretende através da análise do DNA identificar e avaliar as alterações genéticas relacionadas com o transtorno do espectro autista. Tais alterações são decorrentes de mutações que ocorrem no DNA e podem ser herdadas ou adquiridas. Esta pesquisa tem como objetivo correlacionar estas características ao neurodesenvolvimento do indivíduo.

Rubrica do responsável:

Rubrica do pesquisador:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Confidencialidade:** Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Os dados gerados da pesquisa como fotos, ficha de cadastro e o material genético ficaram armazenados durante a execução da pesquisa, cerca de 2 a 5 anos, sob responsabilidade dos pesquisadores. Após este período o material será destruído.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Vocês poderão parar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

**Compensação:** Vocês não receberão qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

**Emergência / contato com a Comissão de Ética:** Durante o estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar: Michele da Silva Gonçalves - Pesquisadora – (31)984440966 [michele.una@gmail.com](mailto:michele.una@gmail.com) ou Profa. Dra. Janaina Matos Moreira – Orientadora da Pesquisa - (31) 99978-6104 [janainamoreira@terra.com.br](mailto:janainamoreira@terra.com.br). Endereço: Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais: Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592 [coep@pppq.ufmg.br](mailto:coep@pppq.ufmg.br)

**Consentimento:** Eu e meu filho entendemos as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim em duas vias, sendo uma para a pesquisa e a outra para o participante, indicando que queremos participar do estudo, até que decidimos o contrário.

Estou ciente de que:

1. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e não interferirá no atendimento ou tratamento médico;
2. Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
3. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
  - ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa e manterei meu telefone de contato sempre atualizado.
  - ( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
4. Caso tenham sido tiradas fotografias:
  - ( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
  - ( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
  - ( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do participante \_\_\_\_\_

Assinatura de seu responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXO III - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE**

(Para crianças de 6 a 11 anos) 1º e 2ª VIA - CAAE:67953817.6.0000.5149

**Introdução:** Você e seu filho está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada: " Caracterização genômica de alterações nas CNVs ( regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) em uma amostragem mineira". Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Você e seu filho(a) serão informados verbalmente e de forma compreensiva sobre a pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e direito de vocês saírem do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Entretanto em caso de dano durante a coleta, profissionais treinados providenciarão os atendimentos necessários. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

**Objetivo:** Realizar testes genéticos para avaliar as alterações no CNVs ( regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em uma amostragem mineira diagnosticada clinicamente com TEA (transtorno do espectro autista ) e estabelecer através dos achados uma associação com a clínica e propor um fluxo de atendimento para exames genéticos.

**Resumo:** O transtorno do espectro autista compreende um grande número de síndromes que possuem sintomatologias semelhantes. Atualmente o diagnóstico é clínico através de observação direta do comportamento e entrevista com os pais. Ainda não há exames específicos para o diagnóstico, apenas exames para exclusão de outras doenças, como exames de imagem, exames genéticos de baixa resolução, exames para distúrbios de metabolismo e alguns testes soriológicos para doenças infecciosas que acomete o cérebro. A análise de DNA vem apresentando bons resultados e surge como uma alternativa para investigar possíveis alterações genéticas. Este estudo pretende fazer a análise genômica e investigar possíveis associações com clínica do participante.

**Procedimentos:** Este estudo irá consistir de uma de uma avaliação desenvolvimental, comportamental, cognitiva e dismorfológica. Estas avaliações são teste de raciocínio, lógica e coordenação motora para observar alguma dificuldade na execução. Já avaliação dismorfológica examinará alguma alteração física, para investigação médica. O único desconforto e cansaço serão durante a execução e espera dos testes. Além disso, será programada uma coleta de sangue periférico por profissional habilitado da criança e dos pais no Laboratório Hermes Pardini. Este procedimento pode causar dor no local, formação de hematoma, e raramente, infecção, lesão de uma artéria ou nervo. Serão utilizadas medidas de segurança para que os riscos e as complicações decorrentes dessa atividade sejam mínimos. Em caso de qualquer complicação, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Dra. Janaina Matos Moreira no telefone 99978-6104 e a Bióloga Michele da Silva Gonçalves no telefone 984440966.

A pesquisa ocorre durante o acompanhamento do tratamento no ambulatório, aproveitando a consulta mensal do paciente agendada periodicamente.

**Crterios de Inclusão:** Diagnóstico clínico prévio de transtorno do espectro autista.

**Benefícios:** A pesquisa pretende através da análise do DNA identificar e avaliar as alterações genéticas relacionadas com o transtorno do espectro autista. Tais alterações são decorrentes de mutações que ocorrem no DNA e podem ser herdadas ou adquiridas. Esta pesquisa tem como objetivo correlacionar estas características ao neurodesenvolvimento do indivíduo.

Rubrica do responsável:

Rubrica do pesquisador:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Confidencialidade:** Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Os dados gerados da pesquisa como fotos, ficha de cadastro e o material genético ficarão armazenados durante a execução da pesquisa, cerca de 2 a 5 anos, sob a responsabilidade dos pesquisadores. Após este período o material será destruído.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Vocês poderão parar sua participação a qualquer momento sem afetar o seu acompanhamento médico.

**Compensação:** Vocês não receberão qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

**Emergência / contato com a Comissão de Ética:** Durante o estudo, para informações a respeito dos direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você pode contatar: Michele da Silva Gonçalves - Pesquisadora - (31)984440966 [michele.una@gmail.com](mailto:michele.una@gmail.com) ou Profa. Dra. Janaina Matos Moreira - Orientadora da Pesquisa - (31) 99978-6104 [jjamoreira@gmail.com](mailto:jjamoreira@gmail.com). Endereço: Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais: Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG - Brasil. 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592 [ceep@cpq.ufmg.br](mailto:ceep@cpq.ufmg.br)

**Consentimento:** Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente pelos pais ou responsável em duas vias, sendo uma para a pesquisa e a outra para o participante, indicando que querem participar do estudo, até que eu decida o contrário.

Estou ciente de que:

1. A desistência não causará nenhum prejuízo para meu filho, e não interferirá no atendimento ou tratamento médico;
2. Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que o nome não seja mencionado;
3. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
  - Desejo conhecer os resultados desta pesquisa e manterei meu telefone de contato sempre atualizado.
  - Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
4. Caso tenham sido tiradas fotografias:
  - concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
  - concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
  - não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE

(Para adolescentes de 12 a 18 anos) 1ª e 2ª VIA - CAAE:67953817.6.0000.5149

**Introdução:** Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada: "Caracterização genômica de alterações nas CNVs (regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) em uma amostragem mineira". Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Você será informado verbalmente e de forma compreensiva sobre a pesquisa. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e direito de vocês saírem do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Entretanto em caso de dano durante a coleta, profissionais treinados providenciarão os atendimentos necessários. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

**Objetivo:** Realizar testes genéticos para avaliar as alterações no CNVs (regiões do DNA que pode ter alterações na quantidade de cópias) em uma amostragem mineira diagnosticada clinicamente com TEA (transtorno do espectro autista) e estabelecer através dos achados uma associação com a clínica e propor um fluxo de atendimento para exames genéticos.

**Resumo:** O transtorno do espectro autista compreende um grande número de síndromes que possuem sintomatologias semelhantes. Atualmente o diagnóstico é clínico através de observação direta do comportamento e entrevista com os pais. Ainda não há exames específicos para o diagnóstico, apenas exames para exclusão de outras doenças, como exames de imagem, exames genéticos de baixa resolução, exames para distúrbios de metabolismo e alguns testes sorológicos para doenças infecciosas que acomete o cérebro. A análise de DNA vem apresentando bons resultados e surge como uma alternativa para investigar possíveis alterações genéticas. Este estudo pretende fazer a análise genômica e investigar possíveis associações com clínica do participante.

**Procedimentos:** Este estudo irá consistir de uma avaliação desenvolvimental, comportamental, cognitiva e dismorfológica. Estas avaliações são teste de raciocínio, lógica e coordenação motora para observar alguma dificuldade na execução. Já avaliação dismorfológica examinará alguma alteração física para investigação médica. O único desconforto e cansaço serão durante a execução e espera dos testes clínicos. Além disso, será programada uma coleta de sangue periférico por profissional habilitado de você e dos seus pais no Laboratório Hermes Pardini. Este procedimento pode causar dor no local, formação de hematoma, e raramente, infecção, lesão de uma artéria ou nervo. Serão utilizadas medidas de segurança para que os riscos e as complicações decorrentes dessa atividade sejam mínimos. Em caso de qualquer complicação, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Dra. Janaina Matos Moreira no telefone 99978-6104 e a Bióloga Michele da Silva Gonçalves no telefone 984440966.

A pesquisa ocorre durante o acompanhamento do tratamento no ambulatório, aproveitando a consulta mensal do paciente agendada periodicamente.

**Critérios de Inclusão:** Diagnóstico clínico prévio de transtorno do espectro autista.

**Benefícios:** A pesquisa pretende através da análise do DNA identificar e avaliar as alterações genéticas relacionadas com o transtorno do espectro autista. Tais alterações são decorrentes de mutações que ocorrem no DNA e podem ser herdadas ou adquiridas. Esta pesquisa tem como objetivo correlacionar estas características ao neurodesenvolvimento do indivíduo.

Rubrica do responsável:

Rubrica do pesquisador:

---



---

**Confidencialidade:** Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Os dados gerados da pesquisa como fotos, ficha de cadastro e o material genético ficaram armazenados durante a execução da pesquisa, cerca de 2 a 5 anos, sob responsabilidade dos pesquisadores. Após este período o material será destruído.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Vocês poderão parar sua participação a qualquer momento sem afetar o seu acompanhamento médico.

**Compensação:** Vocês não receberão qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

**Emergência / contato com a Comissão de Ética:** Durante o estudo, para informações a respeito dos direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você pode contatar: Michele da Silva Gonçalves - Pesquisadora – (31)984440966 [michele.una@gmail.com](mailto:michele.una@gmail.com) ou Profa. Dra. Janaina Matos Moreira – Orientadora da Pesquisa - (31) 99978-6104 [jjamoreira@gmail.com](mailto:jjamoreira@gmail.com). Endereço: Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais: Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592 [coep@pmpq.ufmg.br](mailto:coep@pmpq.ufmg.br)

**Consentimento:** Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim e pelos pais ou responsável em duas vias, sendo uma para a pesquisa e a outra para o participante, indicando que quero participar do estudo, até que eu decida o contrário.

Estou ciente de que:

1. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, e não interferirá no meu atendimento ou tratamento médico;
2. Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meu nome não seja mencionado;
3. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:  
 Desejo conhecer os resultados desta pesquisa e manterei meu telefone de contato sempre atualizado.  
 Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
4. Caso tenham sido tiradas fotografias:  
 concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário  
 concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde  
 não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXO IV - Protocolo para Cadastro

### Caracterização Genômica de Alterações nas CNVs em Pacientes com Transtorno do Especto Autista em uma Amostragem Minerária

#### Protocolo para Cadastro:

#### Dados Epidemiológicos:

Nome: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M Etnia \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_ D.N: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_ D.N: \_\_\_\_\_

Médico responsável: \_\_\_\_\_

Hipótese diagnóstica: \_\_\_\_\_

#### Fatores de Exclusão:

- Alteração na triagem metabólica para erros inatos do metabolismo:

( ) teste do pezinho: \_\_\_\_\_

- Diagnóstico de TEA com alta probabilidade de etiologia não genética:

( ) infecção congênita,

( ) hipóxia neonatal grave,

( ) uso de drogas teratogênicas na gravidez

#### Documentação fotográfica de paciente:

Autorizado: Sim ( ) Não ( ) Data da foto: \_\_\_\_\_

#### Anamnese:

#### GESTACÃO E PARTO

##### Pré-Natal:

Intercorrências: \_\_\_\_\_

Uso de Medicamentos: \_\_\_\_\_

Uso de álcool: \_\_\_\_\_

Parto: \_\_\_\_\_ Idade Gestacional: \_\_\_\_\_

**Caracterização Genômica de Alterações nas CNVs em Pacientes com Transtorno do Especto Autista em uma Amostragem Mineria**

Peso : \_\_\_\_\_ Altura (cm): \_\_\_\_\_

Perímetro Cefálico (P.C): \_\_\_\_\_

Apgar: 1': \_\_\_\_ 5': \_\_\_\_

Manobras em sala de parto: \_\_\_\_\_

Sofrimento fetal: Sim ( ) Não ( )

Alta ( ) dias

Intercorrências: \_\_\_\_\_

**Desenvolvimento Neuropsicomotor (DNPM) :**

Sustentou a cabeça:

Sentou:

Andou:

Falou:

Controle de esfíncter:

Escola:

**EXAME FÍSICO:**

**Data:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Escore Z: \_\_\_\_\_ Estatura: \_\_\_\_\_ Escore Z: \_\_\_\_\_ PC: \_\_\_\_\_ Escore Z: \_\_\_\_\_

Puberdade: Tanner: \_\_\_\_\_

Menarca: \_\_\_\_\_

**Dismorfismos faciais:**

Não ( ) Sim ( )

Olhos: \_\_\_\_\_ Nariz: \_\_\_\_\_

Boca: \_\_\_\_\_ Orelhas: \_\_\_\_\_

Pescoço: \_\_\_\_\_ Outros: \_\_\_\_\_

**Anomalias Congênitas:**

SNC: \_\_\_\_\_

Cardíaca: \_\_\_\_\_

Abdome: \_\_\_\_\_

Renal: \_\_\_\_\_

Genitália: \_\_\_\_\_

Esquelética: \_\_\_\_\_

Pele: \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES**

( ) epilepsia

( ) deficiência mental

( ) cariótipo \_\_\_\_\_

( ) outros afetados na família. Parentesco? \_\_\_\_\_

( ) heredograma no verso

( ) histórico familiar de câncer: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Tipo/Localização: \_\_\_\_\_

## ANEXO V - Protocolo de Extração de DNA Modificado

### Protocolo de extração de DNA Preparação

- Aquecer o banho/termobloco à 56°C.
  - Ligar centrífuga que atinja 20000g.
- 
- Checar se a **RNAse** está pronta para uso, sendo pipetar 1ml de água Tipo 1 para frasco de [**<100mg/ml**] e homogeneizar até que ela se ressuspenda completamente. Caso a RNAse não seja da concentração de [**<100mg/ml**] ressuspender proporcionalmente.
  - Checar se a protease está pronta para uso, sendo pipetar 5.5 ml (**Kit para 250 reações**) de "protease solvent" no frasco contendo QIAGEN Protease liofilizada e homogeneizar até que ela se ressuspenda completamente.
  - Checar se o etanol (96-100%) foi adicionado ao AW1, sendo proceder à adição conforme instruções na garrafa.
  - Checar se o etanol (96-100%) foi adicionado ao AW2, sendo proceder à adição conforme instruções na garrafa.
  - Separar volume necessário de etanol 96-100% necessário para o total de amostras.
- 
1. Adicionar **400 µl de sangue** no tubo (ou usar Buffy coat) e acrescentar **4 µl de solução de RNAse a 100 mg/ml**.
  2. Vortex de **10 segundos**.
  3. Spin no tubo para tirar as gotas da tampa.
  4. Pipetar **40µl de protease K** dentro do tubo de 1,5 ml.
  5. Vortex de **10 segundos**, Incubar por **2 minutos** temperatura ambiente.
  6. Adicionar **400 µl de Buffer AL** na amostra e vortexar por **15 segundos**.  
OBS: Não adicionar a protease K diretamente no Buffer AL.
  7. Incubar a **56°C** por **20 minutos**.
  8. Spin no tubo para tirar as gotas da tampa.
  9. Adicionar **400 µl de etanol gelado (96-100%)** na amostra, vortexar por **15 segundos**.  
Dar um spin no tubo para tirar as gotas da tampa.
  10. Passar a mistura para a coluna e centrifugar por 1 minuto a 6000 g ou 8000 rpm.  
Colocar a coluna em um novo tubo coletor e descartar o filtrado.
  11. Adicionar a coluna **500 µl de Buffer AW1** e centrifugar por 1 minuto a 6.000 g ou 8.000 rpm. Descartar o filtrado e reutilizar o tubo coletor.
  12. Adicionar a coluna **500 µl de Buffer AW2** e centrifugar por 3 minuto a 20.000-g ou 14.000 rpm.
  13. Descartar o filtrado e manter o tubo coletor e centrifugar por 1 minuto a 20.000 g ou 14.000 rpm para eliminar resíduos do buffer.
  14. Incubar 1 minuto de tampa aberta.
  15. Colocar a coluna em um tubo novo de 1,5 ml etiquetado.
  16. Adicionar **20 µl do Buffer AE** diretamente na matrix do tubo. Incubar por **1 minuto** a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.
  17. **Repetir o passo 16** utilizando o mesmo tubo de eluição. (total de 40µl de volume recuperado)

**ANEXO VI - Protocolo com as concentrações e quantidades da PCR modificado de Zhou et al., (2004,2006)**

<b>Reagentes</b>	<b>Reação 1 (µl)</b>	<b>Reação 2 (µl)</b>
Água Reagente Especial	33,5	26,9
Tampão AmpBuffer <sup>1</sup>	-	5,0
Enhancer <sup>1</sup>	-	10,0
MgSO <sub>4</sub> (50 mM) <sup>1</sup>	-	1,5
Tampão HotStart <sup>2</sup>	5,0	-
Qsolution <sup>2</sup>	5,0	-
dNTP (10 mM)	1,0	1,0
Non Met F (20 µM)	1,0	-
Non Met R (10 µM)	1,0	-
MTP-F (10 µM)	-	1,0
Tail-R (10 µM)	-	1,0
MTP-R (10 µM)	-	0,1
Taq Platinum <sup>3</sup>	-	0,5
Taq HotStart <sup>2</sup>	0,5	-
DNA Tratado	3,0	3,0

<sup>1</sup>Fornecido pelo PCR<sub>x</sub> Enhancer System da Invitrogen, <sup>2</sup>fornecido pelo kit HotStarTaq DNA Polymerase da Qiagen e <sup>3</sup>fornecido pela Qiagen.

As reações foram amplificadas no termociclador (Applied Biosystems – Veriti 96-Well Thermal Cycler) com o programa: desnaturação inicial 95°C por 15 minutos, 40 ciclos com 98°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e extensão final com 72°C por 10 minutos. A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador ABI3730 (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) utilizando 0,3µl padrão de peso molecular GeneScan™ LIZ 1200, para a primeira reação e™ ROX 500, para segunda reação e

8,7µl de Formamida HI-DI e 1µL de produto de PCR. Ambos fornecidos pela *Thermo Fisher Scientific*. Os arquivos gerados foram processados no programa *Genemapper*<sup>TM</sup>.

### **Padronização do PCR para gene *FMR1***

A opção de otimização dos protocolos para gene *FMR1* visou a diminuição de custo para possibilitar a execução de todos os testes proposto na pesquisa. Durante a padronização controles com genótipos conhecidos foram inseridos em todas as etapas.

A modificação proposta no ensaio de Zhou *et al.*, 2006, com apenas 2 reações visou não apenas a diminuição de custo, mais devido a composição de 80% de sexo masculino na população. Sendo assim, não justificaria a execução da reação para alelos metilados até 100 repetições CGG, porque na reação para alelos metilados estaríamos visualizamos os alelos na faixa normal, fato que para o sexo masculino e observado apenas na reação para alelos não metilados devido ao tipo de herança. Como mencionado anteriormente os resultados alterados e feminino homozigoto foram confirmados pelo kit AmplideX® PCR/CE FMR1.

## ANEXO VII - Protocolo para reação de PCR para o kit AmplideX® PCR/CE FMR1

O protocolo para realização deste teste seguiu as seguintes condições: 5,75 µL de Buffer GC-Rich Amp; 0,25 µL de iniciadores FMR1 F (sense) e R (antisense); 0,25 µL de iniciador FMR1 CGG; 0,75 µL de diluente; 0,03 µL enzima Polimerase GC-Rich para um volume final 6,5 µL e 1,00µL de DNA a 20 ng.

Neste protocolo realizamos com ½ dos reagentes estabelecidos pelo fornecedor, e para validar as modificações, adicionamos, em todas, ensaios controles com alelos normais e expandidos conhecidos.

A amplificação das amostras seguiu o programa do fornecedor: 95°C por 5 minutos; 10 ciclos de: 97°C por 35 segundos, 62°C por 35 segundos e 68°C por 4 minutos; seguidos de mais 20 ciclos de: 97°C por 35 segundos, 62°C por 35 segundos e 68°C por 4 minutos com 20 segundos acrescidos a cada ciclo; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos e 4°C infinito.

A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador ABI 3730 (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) utilizando 0,3µl padrão de peso molecular Gene Scan™ 500 ROX; 8,7 µL de Formamida HI-DI fornecidos pela *Thermo Fisher Scientific* e 1 µL de produto de PCR. Os arquivos gerados foram processados no programa *Genemapper*™.

## ANEXO VIII - Protocolo para reação dos kits de SALSA MLPA P245-B1 e SALSA MLPA P343-C2

### Reação de MLPA – Protocolo reduzido

Preparo da reação de hibridização do mix de sondas P245-B1 e P343-C2:

Reagentes	1 reação (µL)
SALSA Probe Mix	0,75
SALSA Buffer	0,75
Total por amostra	1,5

As amostras aliquotadas foram colocadas no termociclador no programa de Desnaturação e Hibridização.

Programa de desnaturação e hibridização
98° C por 10 minutos
25° C “infinito” para adicionar a reação hibridização
95° C por 1 minutos
60° C por 17 horas

Preparo da reação de ligação.

Reagentes	1 reação (µL)
Água Reagente Especial	12,5
Ligase Buffer A	1,5
Ligase Buffer B	1,5
Enzima Ligase	0,5
Total	16,0

Após à adição da reação de ligase prosseguiu no termociclador com o programa de ligação.

<b>Programa de Ligação</b>
54°C por 1 minutos para adicionar a reação de ligação
54°C por 15 minutos
98°C por 5 minutos
20°C “infinito”

Preparo da reação de PCR.

<b>Reagente</b>	<b>1 reação (µL)</b>
Água Reagente Especial	3,75
SALSA Primer	1,0
SALSA Taq DNA polimerase	0,5
Total	5,0

Após a adição da reação de PCR prosseguir no termociclador no programa de PCR.

<b>Programa de PCR</b>	
95°C por 30 segundos	35 ciclos
60°C por 30 segundos	
72°C por 1 minutos	
72°C por 20 minutos	
15°C “infinito”	

As reações da MLPA foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems – Veriti 96-Well Thermal Cycler). E posterior eletroforese capilar no sequenciador (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) utilizando 0,3 µL padrão de peso molecular Gene Scan <sup>TM</sup> 500 ROX ®; 8,7 µL de Formamida HI-DI fornecidos pela *Thermo Fisher Scientific* e 1:10 µL de produto de PCR.

### **Padronização da MLPA**

Em virtude da dificuldade em encontrar-se na literatura dados, que pudessem fornecer informações para a otimização da técnica, foi optado pelo uso do protocolo elaborado pelo fabricante para em seguida testar algumas modificações.

### **Avaliação do desempenho da técnica**

Inicialmente, foram avaliados a qualidade da extração, o tempo e condições de armazenamento das amostras e a quantidade de DNA utilizado. Para verificar a qualidade da extração do DNA, as amostras foram avaliadas por espectrofotometria. Os DNAs que não apresentaram níveis de pureza entre 1,8 a 2,0, para as duas razões 260/280 e 260/230 nm, foram descartados da amostra para garantir a confiabilidade dos resultados. Considerando que as coletas do material genético foram realizadas desde 2017 até o ano de 2018, seria necessário verificar se o tempo e a qualidade do armazenamento poderiam interferir no resultado. Entretanto, na dissertação de Mestrado da Bióloga Gabrielle Souza Vianna (VIANNA, 2011) esses pontos foram avaliados nessa mesma amostra apresentando resultados satisfatórios. Em relação à quantidade de DNA utilizado, o fabricante recomenda uma concentração entre 20 a 500 ng. Para o kit SALSA MLPA P245-B1 e kit SALSA MLPA P343-C2, não houve diferença entre os resultados de concentrações no intervalo de 100 e 150 ng. Sendo assim, essa faixa de concentração de DNA foi adotada.

### **Redução do protocolo original**

O produto final da reação de MLPA corresponde a um volume de 50  $\mu\text{L}$ , mas apenas 1  $\mu\text{L}$  são utilizados na eletroforese capilar. Apesar de a técnica ter um custo relativamente baixo por paciente, quando comparada a outros métodos, seria ideal reduzir os volumes preconizados no protocolo recomendado pelo fabricante, com o objetivo de aumentar o rendimento do kit e diminuir o volume descartado. Para padronizar o uso das reações em 25  $\mu\text{L}$ , foram feitos experimentos, comparando-se esta quantidade de reagentes com a quantidade recomendada pelo fabricante (50  $\mu\text{L}$ ). O protocolo com 25  $\mu\text{L}$  foi denominado protocolo reduzido, e o protocolo recomendado pelo fabricante de protocolo original. Foram utilizadas, como parâmetro, controles positivos e controles negativos de ambos os sexos para cada experimento. Em seguida, esses dados foram comparados. Não foram observadas diferenças entre os protocolos.



## ANEXO IX - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P245-B1

Nº Sonda	Gene	Mapview	Sequência LPO	Sequência RPO
01218-L06270	CLDN5	22-017,891319	CTCGTGCCACTCTGCTGGTTTCGCCAAC ATT	GTCGTCCGCGAGTTTTACGACCCGTCTGTG CCCG
01318-L23196	SNRPN	15-022,764248	CTCTAACCTGGTTTTTGCTTGGAATCA GATTCCTCGCTA	CTCCAATATGGCTTTAACCACCTCTTGGTGT CTCAGCTAAGAA
01336-L00878	ELN	07-073,108586	GCTGGGGGCTTTCCCGGCTTT	GGTGTCCGAGTCGGAGGTATCCCTGGAGTC GCAGGTGTCC
01411-L23371	DMD	X-031,555815	TCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTC ATAGAT	TACTGCAACAGTTCCTCCCTGGACCTGGAAA AGTTTCTTGCCTGG
01452-L20745	DRC3	17-017,832032	GGACCTGAGCTTGTTCAACAACCGGA TCTCCAAG	ATCGACTCCCTGGACGCCCTCGTCAAGCTG CAGGTGT
01453-L22689	LLGL1	17-018,076719	CTCCTGTCCCTGCTTGATGACAGCAGT CTGCA	TCTCTGGGAGATTGTCCACCATAATGGCTG TGCCACCTGGAA
02269-L01761	TNFRSF4	01-001,137299	GCACACCCTGCAGCCGCCAGCAA	TAGCTCGGACGCAATCTGTGAGGACAGGGA CCCCCAGCC
02507-L22694	NF1	17-026,576310	CACCAGTCAAATGTCCATGGATCATG AAGA	ATTACTACGTACTCCTGGAGCCTCTCTCCGG AAGGGAAAAGGG
02595-L23366	NSD1	05-176,616671	CGAAGAGTGTGTCCAGAAGTACCCAC CCACTG	TTATGCAGAACAAGGGCTTCCGGTGCTCCC TCCACATCTGT
02600-L15191	NSD1	05-176,648451	CACAACCTAGAATGTCTTGGGAATGG AAAGACTGTT	TGCAAATGTGGAGCCCCGAACTGCAGTGGC TTCTTGG
02890-L02511	GNB1	01-001,746713	GGTGGCATTGAAGAGCACTAAGATCG GAA	GATGAGTGAGCTTGACCAGTTACGGCAGGA GGCCGAGCAAC
03081-L07411	TRPS1	08-116,750248	CCTGCAATCTCTAGCGTCCTCTTTTTT GGT	GCTGCTGGTTTTCTCCAGACCTCGCGTCCTCT CGATTGC
03087-L02487	CREBBP	16-003,869877	GCTGTTTTTCGCGAGCAGGTGAAAA	TGGCTGAGAACTTGCTGGACGGACCGCCCA ACCCAAAAG
03409-L16570	MECP2	X-153,016664	CCAGCATCCGCAAGGGTCCATTAATC CTTA	ACATTCAAATTCGCCCCTAAACCAGTCC CTCCG
03702-L22814	PTCH1	09-097,281171	CCAGCGCCCATGCCCTGCAGACCATG TTCCAGTTAATGACTCC	CAAGCAAATGTACGAGCACTTCAAGGGGTA CGAGTATGTC

03761- L22817	TERT	05-001,335583	CCGTGTACGTCGTCGAGCTGCTCAGGT CTTCTTTTTAT	GTCACGGAGACCACGTTTCAAAAAGAACAG GCTCTTTTTCTACC
04120- L03532	PAFAH1 B1	17-002,515063	GCTTACCTCACAAGCTGTAGGCACTCT	ATAGATCAAGCTATGGCTCTGTGACAGCAA CCATCAATTTTGC
04190- L05920	LETM1	04-001,813236	CACACTCCCATCCACCTGTGTACACA	TCCTCCAGAGGCGATCACCTCGGCTGTTGG GCTCTGAGGCC
04460- L22816	FANCC	09-096,903877	CGGCTCACACTGCTGAGATAACTCAC GA	GATCATTGGCTTTCTTGACCAGACCTTGTAC AGATGGAATCGT
04690- L04068	GABRD	01-001,946238	GATGAATGACATCGGCGACTACGT	GGGCTCCAACCTGGAGATCTCCTGGCTCCC CAAC
05464- L15184	GP1BB	22-018,091521	CCTTCCCTGTGACACAACCGAGCT	GGTGCTGACCGCAACAACCTGACGGCGCT GCCG
06734- L05558	RABL2B	22-049,553066	GGCCTAGCTATAGTTAGGAATACACA AGCC	GTAAAATCGAGTCCTTACAGCCATAACCACA AGGTACGTCCATTTGG
06811- L22815	CYP1A1	15-072,801788	CCCACCAAGAACTGCTTAGCCTAGTC AACCTGAAT	AATAATTTGGGGAGGTGGTTGGCTCTGGA AACCCAGCTG
07530- L22697	PPIL2	22-020,379685	GGAAGCGAGCAGCAGAGGAAGAGCC CTCA	ACCAGTGCCACTGTCCCATGTCCAAGAAG AAGCCCAG
07632- L07317	GATA3	10-008,136771	GGAGAGCGAGACAGAGCGAGCAACG CAAT	CTGACCGAGCAGGTTCGTACGCCGCCCTC CTCCT
08365- L22699	MAPT	17-041,457227	CCTGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGC CAGTGGT	GTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAG CAATGTCT
08395- L08249	DLG1	03-198,276990	CAGTGATCATATTGGGACCTATGAAA GACA	GGATAAATGATGACTTGATCTCAGAATTC CTGACAAATTTGG
08401- L15187	DLG1	03-198,507624	CCACCAAACCTGAAGACAGACAGCTCA GAAGT	TCCATAGAACGGGTTATTAACATATTTTCCAG AGCAACCTCTTTCCAG
08484- L22698	RTDR1	22-021,734047	GTCTCGAGAGGGCAAGAAACAGGTGT GTCATTT	TGACGTCATCCCCATCCTGGTCCATCTGCTG AAAGACCCAG
09310- L13824	MECP2	X-152,949042	TGAGAGCGCAAAGACATTGTTTCATC CTCCA	TGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTG GACAG
09870- L15194	PEX13	02-061,126361	TGACAGCATCAACTGGGCAAGTGGTG AGGATGACCA	TGTAGTTGCCAGAGCAGAATATGATTTTGC TGCCGTATCTGAAGAA
10633- L15194	WHSC1	04-001,865410	CTTCTGGACACTTGTGGTGGCACGAG	TTCCCTTAATGCTTGCTTGATTGATTGACA

L14379			GTGGGCATTTAT	GACAGTCTTGCTCTG
10877-			TGGAGAAGCTGCACCAGTGTTATTGG	AGTGAGCCACCATTTGAATTTGCTAGCTCA
L11547	UBE3A	15-023,204824	A	TGCTGCA
11730-			CGTGCGAGCGCTCACATTTGTTTCTCC	TCTGGCCACCGCGTTCTGGAAGAGGCGAGA
L15192	RAI1	17-017,568036	CAAGGATCTCA	GGGA
11732-				TGGGTGTATTAGCAAACGAGTGTCTCATGG
L13830	NF1	17-026,689192	TCTGCAACCAAGAGCTCTTGTGTCTT	GCAGATAAAG
12031-				TATGCCCAGAACCTCATCGATGATAAGCAG
L13828	SHANK3	22-049,461911	TGCAGTTTCGATACAAGCGGCGAGTT	TTTGCAAAGCTTC
12178-			CAAATTCACAGTGGCCAGCTCACCAC	TGAAAGATACACCACAGGGTGAGAGCATC
L13826	SNRPN	15-022,626072	CACCTGA	CTAACAGCAAAC
14265-			CTTTTGAAGTGTGGTGTGTGAGACTT	GTGCCACGTGGCTGTGGAGTCAGTGTGAT
L22700	SEMA5A	05-009,490899	GGGCTGGA	TCATGATTGA
15311-			GACAAGGAAGGAGGTCTTCCAGCTAT	GTTCTGTGGGTTGGCAGCGTCGTGTGGAT
L17110	MBD5	02-148,932828	ACAA	CAAAATGGAGTGC
15313-			CCATTAGTGGAGTAGTCTCTGTTATCT	CTCCTCTTGGGTTTGGGGGGTCTCATTGTG
L22691	MBD5	02-148,986925	GGAGATCTTC	TGTCACCCT
15315-			GCTCTCTTGAATATGACAACAGAGAA	GCCGAGTTTGTCTGGTGCAGAAAGATGTG
L17114	SATB2	02-200,006365	GAACAC	CTTTTTAGCCAGCT
15318-			GCCAACATCAACATCACAGCTGCCAT	CGAGATCCAACAGGAGATGAAAAGGGCCA
L19750	SATB2	02-199,896807	TTATGA	AGGTGTCTCAA
15319-			CAAGCCTGCCTCTGCTCACTTGTCTG	GACTGGCATGTTCTCTGTGATACTTACATAC
L17592	MECP2	X-152,951215	CA	TTGT
15322-			CCTTTAGCTATCCCAGGAGAGGTGAT	AAACCCACTTAATCTGGCTTCGGTCCTCAG
L17698	EXT1	08-118,918440	AATGTT	CCCTATTCTGG
16348-	PFAFH1		GGACCCAAAAGAATGGATTCCCCGTC	GCATTGAGTGGTCACAGGAGTCCAGTCACT
L22830	B1	17-002,517120	CGCCAGAAAAATAT	CGAGTCATTTTCC
16349-			CTAGGACCCCTGACTCACGACCTCATC	TTGGTGCTACTGCTTGGTGGAGAATGTAAA
L22813	ELN	07-073,120971	AACG	CCCTTTGTAACCC
16748-			CAAATGTGGCTGTGCACACAGGTATC	CTGTATCATCCAGCTTCTAAGGTTTGGGTG
L19368	SNAP29	22-019,565377	CACTTAC	GCTGGCCTGGTACTT
17474-			CAAACCTCCACCATATTGCAAAGCTAT	CGTAACAGTAAAAATGCAGTTGCGGAGACC
L22693	REL	02-060,999129	CACAGAACC	TTCTGACCAGG

18172-			GTTGGGTCTGAACAAGCCTCCGCTTCTT	GCTCAGTACAGGACGTGTCCGGGCTGCCAC
L22729	KANSL1	17-041,499749	ACA	ACAGGTGC
18316-			TCCAGACCAGCAGCCGATACCCACAG	CCTTCCAGGTGGCTGACCGTCACCCAGAGG
L23369	SEMA7A	15-072,494066	AGA	TGGCGCAGAG

## ANEXO X - Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P343-C2

Nº Sonda	Gene	Exo n	Mapview	Cromossomo	Sequência LPO	Sequência RPO
19616- L2745			04-		GTTCCACTGGGAGCAGAT	CGAGGAGCTCAGTTGAGAAATAC
5	ATP8A1	11	042,278439	04p13	CAGATTCTTCTT	ACAGTGGGTTC
08640- L0865			03-		TGCCACCGCGAAGAGTTG	GTCAGCCGCGGGTCTCTCGGGGGC
6	TERC	1	170,965201	03q26.2	GGCTCT	GAGG
12964- L1466			15-		TAGTTCACCGCCCGGCC	CTTTGTCTTCATCGCGCTGCTCAAC
9	ATP10A	1	023,659036	15q12	AACGTGTA	TTCGTGC
10883- L1155			15-		TACATTTCCCATGGTTG	TAATGGGGAAAAAAGGAACTTTTC
3	UBE3A	5	023,152935	15q11.2	TCTACAGGAAGC	GTGACTTGGGAGACTCTCA
10872- L1154	GABRB		15-		TCTTCGCCACAGGTGAGT	TATAGTCCCTTCAGGGGCACTGGC
2	3	6	024,376510	15q12	CCTGCATCCACT	TCCATGG
09431- L0968			11-		TGCCACCTTCGACTACCA	TGGCAACAGCACTGGTGGCTTTGA
0	RBM14	2	066,148469	11q13.2	GCAGGCTTT	TGGGCAA
04620- L1466			15-		CGAAGAAGACTCAGAAG	ATAGGTGATAGCTCACAGGGAGA
8	UBE3A	3	023,167740	15q11.2	CATCTTCCTCAAGG	CAACAATTTGCAAAAATTAG
08376- L0823			15-		TGAGATTCAGCGTTGTTG	TCTCAGGGATGGACACGTTTCAGC
0	KLF13	2	029,452013	15q13.3	AACCCCTT	AGGTCAGTGAGGACAC
11667- L1467			16-		GTGGATGAAGCCGCTTCC	AACTGGACCTTACCAAGAAGGGC
0	HIRIP3	3	029,913975	16p11.2	AGGGAAGACA	AAGAGGCCTCCCAC
08377- L0823			15-		TGAGGATGTAAGTGTTGC	AGTTCACCAGCTTATACCCGAAG
1	NDNL2	1	027,348739	15q13.1	TCTTGGGTTC	ACGTAAGGAGGCGCTC
10868- L1153	GABRB		15-		GGCTCGCCTATTCTGGGA	AACCTCACGCTTGACAATCGAGTG
8	3	4	024,417665	15q12	TCCCTCTC	GCTGACCAGCTATG

20256- L2358			12-			GTTCTGGCAGATACCTCC	TATACCGAGACCTGAAACCCCA
5	LRRK2	41	039,020354	12q12		ACTCAGCCATGATTA	ATGTGCTGCTTTTCAC
10880- L1155			15-			GCATCTAATAGAACGCTA	AACTGAGGGCTGTGGAAATGAAG
0	UBE3A	2	023,171919	15q11.2		CTACCACCAGTT	CCTGCACGAATGAG
01314- L0086			15-			CAAAGGGTGTGCCCTCAC	GATTTTTTTCATTTTGCCAAAAAG
7	APBA2	14	027,196749	15q13.1		CACCCACTT	GGGTATGTCTTTATCAAAG
11668- L1243			16-			GGAGGAAAGGTGGCAGC	CTTAGAGAGGCACAGAGGAGAGA
9	SEZ6L2	1	029,817845	16p11.2		CAGATTA	GATCGGGGTGAGTC
21014- L2948			15-			CTATGGCATCTCACAGCT	
3	SNRPN- HB2-85	SNO	022,848294	15q11.2		CAGGAGGCAAAGAAATC	CCAGGAGGGCTCCTGGTGACCAAT
						CCTT	GCTG
01315- L0933			15-			CCTAGGCGGCATTGGCGA	TTCAGCAATATCCTTTGACAACTC
9	GABRB 3	9	024,344242	15q12		TACCAGGAA	AGGAATCCAGTACAGGAAA
13162- L1244			16-			CCTACGTCAAGCTGCACT	GGAGCCTGTAAGGTAACAGCCTCC
7	DOC2A	4	029,928004	16p11.2		TGCTGCCT	TCTCGCCC
06787- L0738			22-			GAGGCCTGAAGACGACA	CAGTGAGCTCAGCTCCCGCCTGCA
3	SHANK 3	21	049,507581	22q13.33		AACCAACTGTGAT	GCAGCTGAACAAG
11669- L1244			16-			CAATAGGCTTCACCACGG	ACCTGCGCATCCACGCGGTGAAGG
0	MAZ	5	029,728356	16p11.2		CAGCAT	ACCACGG
10886- L1467			15-			CGTGGCTATAACCAGGGAC	AGGTGAGGTACTIONTAGTTCTTCAGA
7	UBE3A	8	023,150555	15q11.2		TCTGTTCTGATT	GGAAGATTTGATTAC
02658- L0212			11-			CTATATGTAGAGGCTGTT	GGGAGAAGTGGGTCTATAGATTT
5	ATM	34	107,675638	11q22.3		GGAAGCTGCTT	CTCTACCATAGCTATAACAACATA
01317- L1292			15-			CGGAGTTCTGGGAAATCG	AGATGAACAGAAAAGACTCTTCTT
5	UBE3A	9	023,136395	15q11.2		TTCATTCATTTAC	GCAGTTTACAACGGGCACA

08874-							
L1921			01-			GTGGGAAGATGTTCCGAA	TGTTCTGGGCACAAGGACTTAAT
5	LEPR	20	065,861195	01p31.3	CCCCAAGAAT		TTTCAGAAGGTTGCTTTTCA
11165-							
L1288			15-			GGTGATGGCCAGCGACTT	ATCCGATACCTGGAGAGGCTCTT
3	ATP10A	16	023,484000	15q12	TGCAGTGCCGAA		GATTCTTCACGGG
12956-							
L0823	CHRNA		15-			GAATATCCAGGGGTGAA	TCCAGATGGCCAGATTTGGAAAC
7	7	4	030,191319	15q13.3	GACTGTTCGTT		CAGACATTCTCTCTATAACA
10875-							
L1154	GABRB		15-			GCAAAGTTTCAGCCTCTC	TCTTTTCTAGGGATCACAACTGTG
5	3	8	024,357380	15q12	ACCACTTTGTT		CTGACAATGACAACCATCAACAC
08389-							
L1467		Intr.	15-			CCAAAACCCGACCTACTA	GGAGTGTTTTGCAGTCTCAAAGCC
1	TJP1	1	027,900944	15q13.1	CGCCTCACAGGCTGAGT		TTATCGCTGGCGTGCGCATA
20567-							
L1400	SHANK		22-			CAGCAGTTTCGATACAAG	TATGCCCAGAACCTCATCGATGAT
7	3	3	049,461911	22q13.33	CGGCGAGTT		AAGCAGTTTGCAAAGCTTC
10870-							
L1154	GABRB		15-			CTCCCTGATACATTTCTC	AATATCTTCCCTCACCCCTGTGTATT
0	3	5	024,379640	15q12	AGCCCTTCTTT		TCAGAATCACCACGACAGC
07631-							
L0731			10-			CACCTAGTTACCCTGACA	GTTCTTCAGGAGATGATTCTGTTTT
6	FGFR2	19	123,229419	10q26.13	CAAGAAGTTCTT		TTCTCCAGACCCCAT
11671-							
L1244			16-			CAGGAGGAGATGGAGGA	TGATGCCGATGGCAACTACTTCCT
2	CD2BP2	4	030,272761	16p11.2	AGGCCACTT		GAACCGGGATG
00550-							
L2242			16-			CGGGAAGTGGAGGTCGT	ATTCAGGCCACCATCATCAGGCAG
3	MVP	5	029,752775	16p11.2	GGAGATC		AACCAGGC
10867-							
L1153	GABRB		15-			CTGTGCTTCCCGCAGGTC	GCGTGGGGATGAACATCGACATCG
7	3	3	024,568655	15q12	CCCCGGTCT		CCAGCATCGACATGGTTTC
11672-							
L1244			16-			CAACCTACCAGGAAGTTT	CATCAGTGCCCCAGGAAACCCCTC
3	SPN	3	029,582828	16p11.2	CCATCAAGATGT		ATGCAAC

08397- L1467			15-			CCTCAGGTCAAAAAGTTT	GGAATGTGAAATCCATT CAGGGAA
2	TRPM1	27	029,081415	15q13.3		ACATGGACATCCTA	AGTTAGACAGATCTGGAC
10874- L1154	GABRB		15-			CTGAGCTTTCGGTTGAAG	TACTTCATTCTTCAGACTTATATGC
4	3	7	024,363881	15q12		AGGAACATTGGA	CCTCTATACTGATAACGA
14190- L1580	SHANK		22-			CAGAAACGGGACCACGA	TTTGTGCTCCGGGGAGCCAAAGGT
0	3	14	049,489494	22q13.33		GGGCTTTGGT	AATGGGGAGT
15766- L2490			14-			CCGAGGTAGCCTGAGGCC	CTTCAGTGTCTGCATGTGGGAAGT
1	MEG3	11	100,396948	14q32.2		TAGGGGAGCTGTTGAGC	GGGCTCCTCACCTACC
07208- L0685			07-			CCATAGCATCTCTATTGT	GGCCATCACCATCCTGGTTGCTCT
8	GHRHR	5	030,977299	07p14.3		AGCCCTCTTCGT	CAGGTTTGTCATC
11673- L2955			16-			CTCCAGAAGGAAAGGAG	TCTTAGGGGAATTCGCTAGGTTTT
7	MAZ	6	029,729166	16p11.2		GAAGAAATGTTT	AACGATTTGTTTCTCCTGC
12951- L2966			15-			CGATCACATTACCTGTTA	ATGTGCACGTGTAAATGGAGTCCC
0	SCG5	6	030,776126	15q13.3		GGCCTCAGCATGGCTT	TGTGAATGACAGCATGTTTC
02040- L0155			15-			CCCGCACCGCCGCTCATG	GCCCTGGCCTTCGGTGCTTGCCTG
3	OCA2	22	025,770116	15q12		TAT	GGAGGTAAGG
02041- L0372			15-			CGACCGCGGAGCACGTG	GCGCACTTGCAGATCTTTCTCCAG
5	OCA2	1	026,017939	15q13.1		CACTTTACCT	GAGTGAGTTTAAGGTCC
11674- L1244			16-			CCAAAGAGGAGAATCCA	AGGCAGTTGAGGAGAGCAGTGAT
5	HIRIP3	4	029,913518	16p11.2		AGGCGAGCCTCAA	GAGGAACGGCAGAGGGA
11675- L1244			16-			CCTGGCAAGCACTACCTG	AACCACATTCTGGGTGAGGGAGGC
6	MAPK3	5	030,036474	16p11.2		GATCAGCTC	CCGGCTG
12720- L1379	SNRPN-		15-			GCTTCCCTAGGGTGCCAA	GTCATCGGCTTGCCCACTGTCTGG
5	HB2-85	SNO	022,858476	15q11.2		AGTTCTTTAAC	CCTGTGGGTGTCAA

11677-							
L1244			16-		CCAAGCTGTGTCTCCTTT	CCAAGGGGCATCCAGTTCAAACGG	
8	LAT	4	028,904647	16p11.2	ACCAGTTTGTAT	CCTCGTGAGTACAAGG	
12954-							
L1446			15-		CCAACATCGTGGCAGAGT	ACATTCCTAAGGACTTTAGTGAGG	
4	SCG5	3	030,759311	15q13.3	TGACTGGAGACA	ATCAGGGGTACCCAGACCCTCC	
10218-					CCTCATTCTTCCCAGAGA		
L1467			07-		GAAGATGTATGGGCTATT	AGATTATCATGACATCTGTGCTTTT	
5	RELN	20	103,057709	07q22.1	GATG	CAACAGCATTAGTCTTGAC	

## ANEXO XI - Tabelas de dados clínicos da crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA acompanhadas no Ambulatório Borges da Costa

IDENTIFICAÇÃO	Idade	Pré-natal	Hipótese diagnóstica Materna	Medição materna na gravidez	APAGAR 1/S'	Idade gestacional	Peso (g) ao nascimento	Sexo	Diagnóstico Inicial	Dismorfismos	Tipo de dismorfismo	Resultado da síndrome X-FRÁGIL N° REPETIÇÕES CGG	Resultado SALSIA-MLPA P245-B1 SINDROMES	Resultado SALSIA-MLPA P343-C2 AUTISMO
HBC 01.1	10	PRÉ-ECLÂMPSIA	-	N	9/10	39s1d	3.200	M	F84 (transtorno global do desenvolvimento)	não		46XY	Não amplificou	Não amplificou
HBC 02.1	9	FÓRCEPS	-	N	9/9	40s	3.995	M	F84/F73(retardo profundo)	leves	face alongadas, olhos com fenda para cima, nariz componte elevada e nariz bulboso, boca filtro curto, leve retrognatia	46XY	NORMAL	SNRPN 214pb dup ??? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 03.1	9	-	-	N		40s	3.250	M		leves	face arredondada, nariz ponte deprimida e ponta arredondada, boca filtro curto, pescoço acantose nigrans, maos com pontas dos dedos levemente afiladas	46XY	NORMAL	RECOLET A SNRPN 214pb dup MAZ 418pb dup TRPM1 (373 pb) del het 15q13

HBC 04.1	13			N	9/9	39s		3.845		SINDROME DE ASPERGER	não		46XY	25 conf amplide x	NORMAL	SNRPN 214pb dup ??? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 05.1	13	HEPATITE B		N		39s		3.200			sim	olhos pequenos e sonbrancelhas arqueadas nariz ponta nasal alta e nariz bulbosa, boca leve prognatismo, orelha baixa implantada, cabelo de implantação baixa na frente	46XY	26	NORMAL	NORMAL
HBC 06.1	11			N		40s		3.260			leves	olho telecanto??, nariz columela rebaixada, orelha pouco baixo implantada	46XY	27	NORMAL	NORMAL
HBC 07.1	8	DIABETES GESTACIONAL, PRE-ECLAMPSIA, ANEMIA, PROTEINURIA, SOFRIMENTO FETAL 2 DIAS		RESPIRIDONA RITALINA LOSARTANA	8/9	38s		2.160	M		leves	nariz columela curta e narina antevertida, boca filtro longo pouco marcado	46XY	26	NORMAL	NORMAL
HBC 08.1	5	AMINORREXE PREMATURA (sic)	FUMANTE 7 Cigarros dias	N	9/10	40s		2.540	F	ALTA APÓS 4 DIAS DEVIDO A QUADRO INFECCIOSO	leves	olhos epicanto/prega epicantais /telecanto ???, boca filtro bem marcado, face media levemente hipoplasica	46XX	26 e 27	NORMAL	NORMAL

HBC 09.1	5			Intravaginal	9/9	40S		3.270		M	GENITALIA HIPOSPODIA	sim	olhos grandes fendas palpebrais, nariz ponte alta e ponta elevada e narinas antevertidas, boca filtro longo, orelhas baixa implantada com curvaturas anômalas, hipoplasia face média	46XY	22	NORMAL	NORMAL
HBC 10.1	12			N	7/10	41s3d		4.080		M	SINDROME DE ASPERGER HIPERATIVO EPILEPSIA DE AUSENCIA FOBIA	leves	boca filtro curto, braços alongados em relação ao tronco, dedos com pontas afiladas, clinodactilia 5º dedo???	46XY	26 conf amplidex	NORMAL	NORMAL
HBC 11.1	13	PRE-ECLAMPISA		PURANT4	9/9	41s		3.910		M	F84/F71 (retardo moderado)	sim	cabelo baixo implantado na frente, olhos fenda levemente para cima nariz ponte deprimida curto e bulboso, boca comissura labial para baixo, orelhas em abano	46XY	26	NORMAL	NORMAL
HBC 12.1	6	CORDOU ENROLOU E ROMPEU 5 DIAS DE SOFRIMENTO FETAL		N	8/8	42		3.075		M	ANEMIA FALCIFORME	não		46XY	27	SONDA SNRPN UP (244pb) del het Regiao de Prader Willi 15q11.2	NORMAL

HBC 13.1	12	BOLSA COM 12H APÓS RUPTURA		N	-/10	40s		3.350	M	CONVULSAO COM 11M NA PRESENCA DE FEBRE ICTERICIA OBESIDADE	sim	olhos implantação funda em orbita e pequenos com fenda para cima, nariz ponte deprimida pequeno e fossa nasal pequena, boca filtro curto, pescoço curto, baixa implantação de cabelo, mãos com ponta leve afiladas	46XY	16	SONDA SEMA7A (190pb) e CYP1A1(331pb) del het Síndrome deleção 15q24	NORMAL
HBC 14.1	16			N		39s			M		sim	implantação baixa de cabelo frente, olhos pequenos, nariz ponte alta e narinas anterovertidas, boca lábios carnudos, orelha baixa implantada, clinodactilia de 5º dedo, pegra ma e E taco de roque	46XY (46,XY,15pstk+) AUMENTO DE TALK DO CROMOSSOMO 15	25	NORMAL	NORMAL
HBC 15.1	13	PRE-ECLAMPISA		N	8/9	30s		2.250	M		leves	face media hipoplasica, olhos fenda elavada para cima nariz pouco bulboso, diastase de incisivos, leve retrognatia	46XY	25	NORMAL	SNRPN 214pb dup ??? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 16.1	9			N		39s		3.500	M		não		46XY (46,X,qh-) IREDUÇÃO DA HETEROCROMATI NA CROMOSSOMO 9	27	NORMAL	NORMAL

HBC 17.1	7	DIABETES GESTACIONAL COLESTASE SOFRIMENTO FETAL 3 DIAS	RUBEOLA	N	9/10	39s	3.000	M	NASCEU COM PEQUENO CEFALO HEMATOMA EM REGIAO PARIENTAL	leves	boca filtro pouco marcado, labios finos, nariz ponta bulbosa, orelhas de abano, leve hipoplasia malar, face média	46XY	19	NORMAL	NORMAL
HBC 18.1	7	HIPOGLICEMIA HIPOXIA		USO DE ALCOOL DURANTE A GESTAÇÃO		37s3 d	2.450	M	CIANOSE, HIPOGLICEMIA, CONVULÇÕES, EPILEPSIA	sim	olhos fenda para baixo, orelha de abano, face media hipoplasica, face alongada	46XY	19	NORMAL	NORMAL
HBC 19.1	6	FRATURA NA CLAVÍCULA		N	8/9	39s3 d	3.740	F	SINDROMES DE SOTOS	sim	olhos telecanto/hipertelorismo, nariz ponte alta elevada, boca ampla/grande, orelhas rodada posteriormente, queixo proeminente	46XX	26 e 34	NORMAL	NORMAL
HBC 20.1	7			N	8/9	39s	2.600	M	ICTERICIA FISIOLOGICA AO NASCER, MICROSSOMICO	sim	microsômico proporcional	46XY	25	SONDA SNRPN UP (244pb) del het Regiao de Prader Willi 15q11.2	SNRPN 214pb dup ???? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 21.1	10	SOFRIMENTO FETAL 18 DIAS		AMITRIPTILINA	8/9	31s5 d	1.700	M	CIANOSE CENTRAL ICTERICIA DOENÇA DA MEMBRANA HIALIANA	não		46XY	26	NORMAL	SNRPN 214pb dup ???? Sem rep MAZ 418pb dup

HBC 22.1	17			N	9/10	39s		3.950	M	CISTO EPIDEMOIDE FRONTAL DIRETO - CIRURGIA 2003	leves	impressão de alta estatura constitucional, orelhas em abano, maos grandes	46XY	24	NORMAL	NORMAL
HBC 23.1	10	PRE-ECLAMPISA		CEFALOXINA		38s3 d			M	F09 (com lesão cerebral) ICTERICIA	sim	fronte ampla, nariz ponte alta columela alongada, orelhas em abano helices pontiagudas, mãos dedos alongados finos	46XY	28	NORMAL	SNRPN 214pb dup ???? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 24.1	10					38s3 d			M	F84	sim	sobrancelhas grossas e arqueadas, orelhas em abano helices protusas, leve clinodactilia 5° dedo	46XY	26	NORMAL	SNRPN 214pb dup ???? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 25.1	15	SOFRIMENTO FETAL 2 DIAS	DEPRESSÃO O POS PARTO	N		40s		2.970	F	ICTERICIA, OBESIDADE DELEÇÃO CROMOSSOMO 22 ??	sim	fronte curta, cabelo implantação baixa, olho ptose palpebral inclinado para cima,nariz ponte nasal alargada ponta rebaixada, orelha pequena aletas antevertidas, pescoço acantose nigrans, mão prega m taco de hockay pontas afiladas	46XX	22 e 27 conf. amplide x	SHANK3 (252pb) e RABL2B (382 pb) del het Sindrome Phelan- McDermid 22q13	SHANK3 EXON 3,15 E 22 del het

HBC 26.1	10			N	8/9	39s		3.350	M	EPILEPSIA ADNPM GENITALIA DISMORFICA	sim	cabelo baixo implantado fronte, olhos impressão de telecanto, sobrancelhas arqueadas,nariz ponta elevado, boca filtro longo, labio superior fino, incisivos longos, face media hipoplasica	46XY	29	NORMAL	NORMAL
HBC 27.1	11	SOFRIMENTO FETAL 2 DIAS		N		40s		3.352	F		sim	alta implantação cabelo na fonte, olhos sobrancelhas esparsas, nariz ponte alta e ponta rebaixada columela longa,boca labios grossos filtro curto, orelhas de abano baixo implantada	46XX	20 e 26	NORMAL	NORMAL
HBC 28.1	11			N	9/9	39s		2.800	M		leve s	lordose-tonus abdominal fraco	46XY	16	NORMAL	NORMAL

HBC 29.1	6	DIABETES GASTACIONAL SOFRIMENTO FETAL 2 DIAS		METILDOPA		38s		3.200	M	DIAGNOSTICO DE TU CEFALICO BENIGNO AO 4 MESES DE GESTAÇÃO. NEGADO APÓS NASCIMENTO	sim	fronte ampla com alta implatção, olhos sobracelhas esparsas, nariz ponta elevada e curto ponte rebaixada, boca filtro curto, face media hipoplasica queixo pontudo.	46XY	25	NORMAL	NORMAL
HBC 30.1	10			N	9	39s		2.930	M	DOENÇA DE REFLUXO GASTROESOFAGICO	sim	nariz ponta rebaixada levemente, leve retrognatia	46XY	25	NORMAL	SNRPN 214pb dup ???? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 31.1	7			N		41s		3.750	F	F84,F80.1,F82 Transtorno expressivo de linguagem	leve s	cabelo de implantação baixa, fronte curta, olhos sobracelhas arqueadas, nariz ponte alta	46XX	26	NORMAL	SNRPN 214pb dup ???
HBC 32.1	9	SOFRIMENTO FETAL 6 DIAS		N		43s		3.105	M		leve s	turicefalia???	46XY	26	NORMAL	NORMAL

HBC 33.1	11	OBSTRUÇÃO DE URETER DIREITO		N	-/9	39s	2.880		F84	sim	cabelo baixo implantados, olhos inclinados para baixo, sobrancelhas esparsas, nariz ponte nasal alardaga, orelhas muito baixo implantada, face media hipoplásica	46XY	27	NORMAL	NORMAL
HBC 34.1	9	INFECÇÃO AO NASCER		N		39s	3.140	M	F10 ( uso de alcool)	não		46XY (inv(9)(p12q13)) INVERSÃO DA HETEROCROMATI NA CROMOSSOMO 9	26	NORMAL	SNRPN 214pb dup ??? Sem rep MAZ 418pb dup
HBC 35.1	14	ADOTADO				32s			CITOMEGALOVIRUS	sim	sobrancelhas grossa, nariz ponte e dorso conico ponta rebaixada, boca filtro longo labios finos, orelhas rebaixada, face media hipoplasica	46XY	23	NORMAL	SNRPN 214pb dup???
HBC 36.1	9			N		39s6 d			ANEMIA FALCIFORME	leve s	orelhas em abano, maos pontas afiladas	46XY	16	NORMAL	NORMAL

HBC 37.1	11			N	8/9	41s	3.060	M	F84	sim	fronte curta, baixa implantação de cabelo, olhos fendas para baixo, orelhas baixo implantada/assimétricas, orelhas baixa implantada/assimétricas, impressão de palato ogival alto e estreito, mãos pontas afiladas falange distal hiperfletidas.	46XY	37	NORMAL	SNRPN 214pb dup???
HBC 38.1	4	ITU recorrente		FLUOXACIN RANITIDINA	8/8	38s	3.455	F		sim	fronte curta com baixa implantação de cabelo, olhos estrabismo divergente, boca diastose, orelha auricular grande, pescoço curto.	46XX	22 e 26	NORMAL	NORMAL
HBC 39.1	14	HEPATITE B		N	9/10	39s	3.250	M		não		46XY	16	NORMAL	NORMAL
HBC 40.1	15			N		40s	3.040	M	SINDROME DE ASPERGER	não		46XY	26	NORMAL	NORMAL

HBC 41.1	4	SOFRIMENTO NO PARTO		N	8/10	38s		3.480		M		não		46XY	26	NORMAL	SNRPN 214pb dup??
HBC 42.1	10			VITAMINA	8/9	42s		3.510		M	F84/F90 (transtorno do comportamento e emocionais)	sim	olhos meia lua palpebras caida fenda inclinada para abaixo, impressão de telecanto, boca labio superiro fino, nariz ponte aloganda, orelhas implantada e rodada posterior	46XY	26	NORMAL	NORMAL
HBC 43.1	12			N		38s		3.900		M	SINDROME DE ASPERGER	não		46XY	20	NORMAL	REP APLICAÇÃ O NORMAL 23/01
HBC 44.1	13			N		40s		3100		M	TDH/DEFICT DE ATENÇÃO	leve s	face hipotonica, boca intraberta	46XY	16 conf amplide x	NORMAL	NORMAL
HBC 45.1	7	HIPERTIREOIDIS MO SOFRIMENTO FETAL		Propiltiouracil		36s		2.250		F	F84/PERCENTIL :3	não		46XX	25 e 27	NORMAL	NORMAL

HBC 46.1	7	PRÉ-ECLAMPSIA DEPRESSÃO		N	9/10	37s5 d		2,770	M	F84.5 ( Síndrome de Asperger)	leve s	baixa implantação de cabelo, olhos miopia, nariz columela curta ponte elevada filtro marcado, face media plana	46XY	27	NORMAL	NORMAL
HBC 47.1	11			N	9/10	37s		3,100	M		não		46XY	20	NORMAL	NORMAL
HBC 48.1	13			N	9/10	39s		3,450	M		sim	face media plana, olhos impressão de telecanto, nariz tubular ponte alongada, orelhas baixo implantada com dobras anomalas,boca filtro curto	46XY	24	NORMAL	NORMAL
HBC 49.1	5	ALERGIA			9/10	39s		3,255	F	ERROS INATOS ALTERADOS(PIRUVAT O QUINASE)	sim	maos com polegar digitalizado e distal, nariz curto ponte elevada, boca filtro longo , labio superior invertido	46XX	20 e 34	NORMAL	REP TRPM1 (373 pb) del het 15q13 NORMAL REPETIÇÃO O 23/01
HBC 50.1	9	PRÉ-ECLAMPSIA ICTERICIA				36s		3,500	M	TDH	leve s	orelhas baixa e abano helixe grandes	46XY	25	REPETIÇÃO	SNRPN 214pb dup???

HBC 51.1	12	VACINA DE FEBRE AMARELA 1º TRIMESTRE, TDAH MATERNO			8/9	38S		3,150	M	SINDROME DE ASPERGER TRANSTONO OBSESSIVO COMPULSIVO ANSIEDADE	não	remete a etinia	46XY	27	NORMAL	NORMAL
HBC 52.1	11	PRÉ-ECLAMPسيا, HIPOXIA, ICTERÍCIA COM FOTOTERAPIA, SEPSE			7/5	31s		1,500	F	F84/F71.1 (retardo mental moderado)	não		46XX	20 e 26	REPETIÇÃO	REP TRPM1 (373 pb) del het 15q13 NORMAL REPETIÇÃO O 23/01
HBC 53.1	8	IRMÃ COM TEA			9/9	37s		2,950	F	SINDROME DE ASPERGER	não		46XX	20 e 26 conf amplide x	NORMAL	REP / REP 23/01 TRPM1 (373 pb) del het 15q13
HBC 54.1	5	PRÉ-ECLAMPسيا, SOFRIMENTO FETAL, CONVULSÕES, DUAS IRMÃS COM TEA			5/5	28		650 gr	F	SINDROME DE ASPERGER	não		46XX	20 e 26	NORMAL	REP TRPM1 (373 pb) del het 15q13 NORMAL REPETIÇÃO O 23/01
HBC 55.1	14	DEPRESSÃO MATERNA, TCE LEVE AOS 9 MESES			10/10	38S		2,600	M	F90 (trasntorno do comportamento e emocionais) F29 (psicose não organica não especificada)	sim	face alongadas e face media plana, olhos para cima sinofris, boca labios grossos, orelha de abano	46XY	26	NORMAL	NORMAL

HBC 56.1	12	PARADA CARDÍACA, EPILEPSIA NEONATAL, SEPSE, HIPOXIA			4/4	39s		2,740	M	TDH	leves	cabeça com impressão de turricefalia, orelhas grandes	46XY	27	NORMAL	NORMAL
HBC 57.1	12	CRISES CONVULSIVAS NEONATAIS			9/9	41s		3,500	F	F84 Ressonância alterada	fazer		46XX	25 e 27	NORMAL	NORMAL
HBC 58.1	8	HIPOTIREOIDISMO			9/10	39s		3,500	F		leves	sonbrancelhas esparsas, nariz ponta elevada e curta, boca diastose de incisivos	46XX	21 e 23	NORMAL	NORMAL
HBC 59.1	5	CMV MATERNO, CMV CONGÊNITO DESCARTADO, ICTERÍCIA			8/9	39s		3,155	M	F84/ F93 (transtorno emocionais da infância)	leves	orelhas com formato das helices anormais traço bem implantadas, boca com filtro longopouco marcado labios superior fino.	46XY	16	NORMAL	REPETIÇÃO
HBC 60.1	6	DESCOLAMENTO DE PLACENTA NO 3º MÊS, IRMÃO COM TEA			7/9	40s		3.395	M		fotografar		46 XY	11	NORMAL	NORMAL
HBC 61.1	3	TABAGISMO			9/10	38s		3.000	F		leves	retrognatia leve, nariz columela alongada ponta bulbosa	46XX	19 e 21	NORMAL	NORMAL

HBC 62.1	7	TROMBOSE, LABIRINTITE, TRABALHO DE PARTO PROLONGADO (>18h)			8/9	38s		3.400	M	F90(trasntorno do comportamento e emocionais)/F84 CRISE CONVULSIVAS	sem foto		46XY	26	NORMAL	NORMAL
HBC 63.1	8				9/10	36s5 d		2,990	M	F84	não		46XY	21	NORMAL	NORMAL
HBC 64.1	12	PRÉ-ECLAMPسيا, CIUR, DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA, ICTERÍCIA, SEPSE NEONATAL, HEMORRAGIA CEREBRAL	EPILEPSIA		2/7	31		1,100	M		sim	baixa implantação dos cabelos na fronte, sinofres, nariz ponte nasal elevada ponta bulbosa, boca filtro curto labios proeminente, retrognatia leve, face alongada, maos dedos longos e finos pregas palmares com transversa imcompeleta mao esquerda	46XY	21	NORMAL	NORMAL

