Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

***CNVs* EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

FERNANDA BUENO BARBOSA

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto
2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

CNVs EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

FERNANDA BUENO BARBOSA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética/FMRP

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Fernanda Bueno.

CNVs em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico/ Fernanda Bueno Barbosa; orientador Aguinaldo Luiz Simões. – Ribeirão Preto, 2013.

127 f. il. 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Genética.) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Variação no número de cópias; 2. LES; 3. Hibridação Genômica em *arrays*; 4. *GeneChip*; 5. Variabilidade genética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA BUENO BARBOSA

CNVs EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética

APROVADO EM: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esta dissertação
a duas pessoas, Roberto e Regina,
que em nenhum momento mediram esforços
para realização dos meus sonhos,
que me guiaram pelos caminhos corretos,
me mostraram que a honestidade e o respeito
são essenciais à vida, e que devemos sempre
lutar pelos nossos objetivos. Tenho muito
orgulho por chamá-los de pai e mãe.*

Agradecimentos

À Deus, que me iluminou e me deu forças durante toda a trajetória.

Aos meus pais Roberto e Regina, e irmãos Roberto, Gabriel e João Eduardo pela compreensão, apoio, e respeito as minhas ausências. Obrigada pelo incentivo, pela confiança e amor.

Ao orientador Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, o meu reconhecimento e gratidão pelos ensinamentos ao longo desses dois anos, pelo incentivo e confiança a mim depositada.

À Prof^a Dr^a Milena Simioni. A sua participação foi imprescindível para a realização deste trabalho. Muito obrigada por sempre acreditar que iria dar certo, pela ajuda, pela prontidão e disponibilidade.

À Prof^a Dr^a Vera Lúcia Lopes pela oportunidade de colaboração com o seu grupo de pesquisa, pela receptividade em seu laboratório e gentileza.

Ao Prof. Dr. Eduardo Donadi por ter gentilmente cedido as amostras e a todos os pacientes voluntários, sem os quais esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

À banca examinadora pela disposição em participar na contribuição para o crescimento deste trabalho.

Ao Julian, pelo companheirismo, compreensão, paciência e amor. Obrigada pelo apoio incondicional.

Às amigas Nathalia e Laís pelo convívio diário. A presença de vocês, o apoio e descontração tornaram cada momento mais agradável.

Aos colegas do Bloco B, em especial Maria, Ana Lúcia, Juliana, Flavia, Natalia, Leonardo, Nadia, Marcela, Sabrina, Cláudia Wiesel, Cláudia Caixeta, Edna e Rosana, pela prazerosa convivência, pelas sugestões, apoio e incentivo.

Às amigas de infância Amanda, Carolina, Luiza e Raíssa, e aos amigos que fiz durante a graduação Patrícia, Mariana, Lyzia, Helder, Tati, Hellen, Dani,

Vinicius e Carol. A amizade de vocês é um presente de Deus. Obrigada pelo carinho, atenção e incentivo.

Aos meus *pequenos* Mylena, Branca, Eduardo, Isabela e Thaís, que fazem da minha vida uma alegria, com os seus sorrisos e gracinhas.

Ao primo-irmão Ronaldo e irmã de coração Olivia, por sempre terem me escutado, aconselhado e incentivado.

À Maria Eugênia Camargo do Laboratório de Microarranjos do CNPEM, que auxiliou na realização da técnica de *aGH*.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e Departamento de Genética pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma, me auxiliaram, incentivaram ou proporcionaram bons momentos para a continuação e finalização deste trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos”

Le Petit Prince
(Antoine de Saint-Exupéry)

Resumo

BARBOSA, F.B. **CNVs em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2013. 127p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Palavras-chave: variação no número de cópias, LES, Hibridação Genômica em *arrays* de alta densidade, *GeneChip*, variabilidade genética.

O genoma humano varia entre os indivíduos não somente na forma de sequência, mas também estruturalmente. Originalmente, organismos diploides possuem duas cópias de cada região autossômica, uma por cromossomo. Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares de identificação do DNA, foram descritas sequências que se repetem em diferentes regiões do genoma em número maior ou menor do que as duas cópias esperadas. Essas variantes são denominadas *copy number variants* (CNVs) e definidas como segmentos genômicos, geralmente maiores do que 1 kilobase (kb), que variam em número de cópias em comparação com o genoma de referência. As CNVs podem contribuir para a variabilidade do risco entre os indivíduos na etiologia de doenças complexas. Nesse contexto, o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune com forte componente genético, caracterizada por inflamação crônica e produção de autoanticorpos. Estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) identificaram vários *loci* associados ao LES que contribuem para a susceptibilidade à patogênese. Entretanto, as pesquisas atuais com CNVs e LES focalizam apenas a análise individual de algumas variantes. O objetivo do presente trabalho foi conduzir o primeiro estudo de CNVs em larga escala em pacientes com LES. A detecção de CNVs foi feita por ensaio de Hibridação Genômica em *arrays*, utilizando a plataforma *Affymetrix GeneChip® CytoScan™ HD* em amostra de 23 pacientes com LES. Foram identificadas 406 CNVs distribuídas em todos os cromossomos, exceto no Y. A média foi de 18 CNVs por paciente. As deleções foram mais frequentes do que as duplicações, 311 e 95, respectivamente. O perfil de CNVs revelou 269 CNVs envolvendo genes, 152 CNVs únicas e 59 regiões de CNVs (CNVRs). Nove CNVs identificadas não haviam sido descritas em bancos de dados de variantes estruturais. Adicionalmente, encontramos CNVs em cinco genes previamente associados com LES: *CFHR4*, *CFHR5*, *STAT4*, *MECP2* e *HLA-DPB2*. CNVs nestes genes foram reportadas em pacientes com LES pela primeira vez. O conhecimento das CNVs associadas com LES e autoimunidade podem contribuir para o entendimento da etiologia da doença. Em conclusão, o presente estudo foi o primeiro delineamento em larga escala de CNVs do genoma completo em pacientes com LES.

Abstract

BARBOSA, F.B. **CNVs in Systemic Lupus Erythematosus Patients**. 2013. 127p. Master's Dissertation – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Keywords: copy number variation, SLE, high-resolution array Genomic Hybridization, GeneChip, genomic variability.

The human genome varies between individuals not only at the sequence level but also structurally. Originally, diploid organisms have two copies of each autosomal region, one per chromosome. Advances in molecular-based techniques for DNA identification enabled the description of many repeated sequences with higher or lower copy number than that two copies expected. Those sequences are termed *copy number variants* (CNVs) and are defined as genomic segments, usually greater than 1 kilobase (kb) in size, ranging in copy number when compared to reference genome. CNVs can contribute to risk variability among individuals in complex diseases etiology. In this context, Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with strong genetic component and is characterized by chronic inflammation and autoantibodies production. To date, genome-wide association studies (GWAS) have identified several *loci* associated with SLE that contribute to pathogenesis susceptibility. However, current CNVs studies associated with SLE focus only in few variants analysis. The aim of the present study was to conduct the first genome-wide CNVs study in SLE patients. CNVs detection was performed by high-resolution array Genomic Hybridization Assay, using the *Affymetrix GeneChip® CytoScan™ HD* platform, in 23 SLE patients samples. We identified 406 CNVs distributed in all chromosomes, except Y. The average was 18 CNVs per patient. Deletions were more frequent than duplications, 311 and 95, respectively. CNV profile showed 269 CNVs overlapped by genes, 152 unique CNVs and 59 CNV regions (CNVRs). Nine CNVs were never described in structural variants databases. We found CNVs in five genes previously associated with SLE: *CFHR4*, *CFHR5*, *STAT4*, *MECP2* and *HLA-DPB2*. CNVs in these genes were reported in SLE patients for the first time. Knowledge of CNVs associated with SLE risk and autoimmunity could also improve our understanding of disease etiology. In conclusion, the present study was the first effort to search for CNVs in whole genome of SLE patients.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Frequência das manifestações clínicas no Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	23
Tabela 2. Critérios do <i>American College of Rheumatology</i> para o diagnóstico de LES.....	24
Tabela 3. Parâmetros de qualidade dos experimentos de <i>aGH</i>	54
Tabela 4. Distribuição de CNVs nos pacientes com LES.....	55
Tabela 5. Distribuição das faixas de tamanho das CNVs encontradas nos pacientes.	56
Tabela 6. Grandes CNVs (>450 kb) identificadas na amostra de pacientes com LES.....	57
Tabela 7. Recorrência das CNVs por cromossomo.....	59
Tabela 8. CNVRs encontradas nos pacientes com LES.....	60
Tabela 9. Distribuição geral das CNVs que possuem genes nos pacientes com LES.....	64
Tabela 10. CNVs com genes descritos no OMIM.	66
Tabela 11. CNVs não descritas no DGV.	68
Tabela 12. CNVs não descritas em banco de dados.	69
Tabela 13. CNVs em genes relacionados com autoimunidade.	71
Tabela 14. CNVs comuns presentes no conjunto amostral.....	72
Tabela 15. Proporção variável do genoma representada pelas CNVs nos pacientes com LES.	76

Lista de Figuras

Figura 1. Genótipos possíveis quando há variação do número de cópias....	16
Figura 2. Paralelo entre as descobertas genéticas e a determinação de genes em associação com LES.	27
Figura 3. Padrão de bandas do gel de agarose 2% dos produtos amplificados da PCR.....	41
Figura 4. Padrão de bandas do gel de agarose 4% dos produtos fragmentados.....	44
Figura 5. Representação de uma região de <i>CNV</i>	51
Figura 6. Gráfico mostrando a distribuição de tamanhos das <i>CNVs</i> nas amostras de LES.	56
Figura 7. Distribuição das <i>CNVs</i> encontradas por cromossomo.	58
Figura 8. Distribuição do total de <i>CNVs</i> comparado àquelas que possuem genes nos pacientes com LES.	63
Figura 9. Localização genômica das <i>CNVs</i> não descritas em banco de dados.	70
Figura 10. Localização genômica das <i>CNVs</i> relacionadas com autoimunidade.	71
Figura 11. Processos biológicos dos genes envolvidos com autoimunidade presentes nas <i>CNVs</i> encontradas nos pacientes com LES (<i>PANTHER Classification System</i>).	73

Sumário

INTRODUÇÃO	15
VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNVs)	15
Definição e Base Genética	15
Histórico	15
Efeitos Genômicos	18
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	19
O Lúpus	19
Etiologia	19
Patofisiologia	22
Manifestações clínicas	23
Critérios de diagnóstico	24
Epidemiologia	24
BASE GENÉTICA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	25
JUSTIFICATIVA	29
HIPÓTESE	30
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
DESENHO EXPERIMENTAL	32
COLABORADORES	33
CASUÍSTICA	33
Critérios de Seleção das amostras	33
ASPECTOS ÉTICOS	34
ANÁLISE LABORATORIAL	34
Extração do DNA das amostras de pacientes	34
Avaliação da integridade do DNA	35
Eletroforese em gel de agarose	36
Quantificação e Diluição das amostras	36
Detecção de CNVs: Hibridação Genômica em <i>arrays</i>	37
Digestão do DNA	37
Ligação aos adaptadores	38
Amplificação dos fragmentos por PCR	39
Purificação dos produtos da PCR	41
Fragmentação	43

Pré-Marcação	44
Hibridação nos <i>chips Cytoscan HD™</i>	45
Lavagem e Marcação	46
Escaneamento	47
ANÁLISE DOS DADOS	47
Determinação de CNVs pelo <i>software ChAS</i>	47
Modelo de referência de populações do projeto <i>HapMap</i>	48
Padrões de qualidade dos experimentos	48
Análise padrão	49
Avaliação das CNVs descritas em bancos de dados	50
Determinação do padrão de recorrência das CNVs	51
Análise de regiões específicas: <i>cytoregions</i>	51
RESULTADOS	53
QUALIDADE DOS EXPERIMENTOS DE <i>aGH</i>	53
ANÁLISE DAS CNVs	54
Distribuição das CNVs na amostra de pacientes com LES	54
Distribuição de tamanho das CNVs identificadas	55
Distribuição de CNVs nos cromossomos	58
Padrão de recorrência das CNVs	58
Distribuição geral das CNVs envolvendo genes	63
CNVs com genes descritos no <i>OMIM</i>	65
CNVs não descritas no <i>DGV</i>	67
CNVs não descritas em banco de dados	69
CNVs em genes relacionados com autoimunidade	70
CNVs comuns em genes relacionados com autoimunidade	72
DISCUSSÃO	74
CASUÍSTICA	74
QUALIDADE DOS DADOS	74
PROPORÇÃO VARIÁVEL DO GENOMA	75
PERFIL DE CNVs NO GENOMA	77
RECORRÊNCIA DE CNVs	78
RELEVÂNCIA FUNCIONAL DAS CNVs IDENTIFICADAS	79
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE	95

INTRODUÇÃO

VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS)

DEFINIÇÃO E BASE GENÉTICA

O genoma humano varia entre os indivíduos não somente na forma de sequência, representado pelos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), mas também estruturalmente (STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, 2010). Organismos diploides possuem duas cópias de cada região autossômica, uma em cada cromossomo homólogo. Entretanto, duplicações e deleções podem resultar em alterações no número diploide de cópias dos segmentos no genoma (CHOY et al., 2010). Com o avanço das técnicas moleculares de identificação e análise do DNA, foram descritas sequências que se repetem em diversas regiões do genoma em número diferente das duas cópias esperadas (ISKOW; GOKCUMEN; LEE, 2012). Essas variantes são denominadas *Copy Number Variations* (CNVs) e definidas como segmentos genômicos, geralmente maiores do que 1 kilobase (kb), que variam em número de cópias em comparação com o genoma de referência (ALKAN; COE; EICHLER, 2011) (Figura 1). Esta forma de variação é análoga aos micro e minissatélites, que consistem em unidades repetitivas curtas (2-4 nucleotídeos e 10-100 nucleotídeos, respectivamente), entretanto, o termo CNV refere-se a grandes regiões repetidas que incluem centenas de nucleotídeos (WAIN; TOBIN, 2011).

A estrutura de uma CNV é caracterizada por ganhos ou perdas de sequências homólogas em múltiplos locais no genoma, e pode envolver tanto duplicações de segmentos *in tandem* quanto translocações (REDON et al., 2006). Adicionalmente, as CNVs não possuem necessariamente genótipos dialélicos. A ocorrência de CNVs multialélicas, isto é, as que apresentam mais de um evento de duplicação e/ou deleção no mesmo *locus* é possível (WAIN; TOBIN, 2011). Dependendo da região genômica variável, as CNVs podem conter genes completos ou parciais (MANOLIO et al., 2009).

Figura 1. Genótipos possíveis quando há variação do número de cópias. A) Variação no número de cópias normal: número de cópia (CN) diplóide. B) Variação dialélica; (i) deleção heterozigótica e homozigótica resultando um número de cópias de um e zero, respectivamente; (ii) duplicação heterozigótica e homozigótica resultando um número de cópias de três e quatro, respectivamente. C) Alguns exemplos de variação multialélica em que se observa que o mesmo número de cópias pode ser obtido por diferentes combinações genóticas (Adaptado de WAIN; TOBIN, 2011).

HISTÓRICO

O estudo de doenças que envolvem modificações no número de cópias no genoma humano é conhecido desde a década de 1970 (HE; HOSKINS; MCLEOD, 2011). Entretanto, a dimensão dessa variabilidade só se tornou evidente em 2004, quando dois trabalhos independentes (IAFRATE et al., 2004; SEBAT et al., 2004) demonstraram que indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam no número de cópias, as CNVs. A análise do conteúdo de tais CNVs revelou que a maioria dessas regiões deletadas ou duplicadas do genoma incluía genes e que parte delas foram observadas em mais de um indivíduo, sugerindo caráter polimórfico (IAFRATE et al., 2004). Dessa forma, a descoberta das CNVs como fonte significativa de variabilidade forneceu evidências para uma visão mais ampliada da variação genética humana (ZHANG et al., 2009).

Os primeiros estudos de CNVs foram baseados em Cromossomos Artificiais Bacterianos em *arrays* (BAC *arrays*) ou em plataformas de oligonucleotídeos de baixa resolução, que permitiram apenas a detecção de CNVs superiores a 100 kb (SEBAT, 2007). Todavia, os limites dessas alterações não foram bem definidos o suficiente para permitirem uma avaliação exata da proporção do genoma alterado. Isto levou a uma superestimação da extensão do número de cópias, que foi posteriormente refinada por ensaios de microarranjo, primordiais na descoberta e genotipagem de CNVs (CHOY et al., 2010; ITSARA et al., 2009). Estes são representados principalmente pela hibridação genômica em *arrays* (*aGH*), hibridação genômica comparativa em *arrays* (*aCGH*) e polimorfismo de nucleotídeo único em *arrays* (*SNP array*). As técnicas são baseadas em hibridação para inferir os ganhos ou perdas no número de cópias, comparados com amostras de referência ou da população, mas diferem nos detalhes e na aplicação dos testes moleculares (ALKAN et al., 2011).

As novas tecnologias desenvolvidas proporcionaram mapeamento mais preciso das CNVs (FANCIULLI et al., 2007). Em 2006, o primeiro mapa abrangente de CNVs do genoma humano foi construído (REDON et al., 2006), o que caracterizou-se como um recurso para estudos de estrutura do genoma. As observações decorrentes desse mapa e de trabalhos subsequentes (JAKOBSSON et al., 2008) evidenciaram a complexidade dessa forma de variação genômica. Os estudos atuais focam-se em triagem da extensão total da variação estrutural com o intuito de compreender seus efeitos sobre as doenças humanas, as características complexas e evolução (ALKAN et al., 2011).

Com o aumento do conhecimento sobre as CNVs, a anotação precisa destas variantes tornou-se necessária. Atualmente, bancos de dados estão disponíveis para o registro de variantes genômicas (ZHANG et al., 2009). O principal deles é o *DGV* (Database of Genomic Variants) (IAFRATE et al., 2004) no qual estão catalogadas 610.834 CNVs até a presente data (Janeiro, 2013).

EFEITOS GENÔMICOS

O desvio do estado diploide esperado tem consequências quando são envolvidas grandes regiões genômicas (STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, 2010). Os transtornos genômicos, tais como síndrome de *Down*, síndrome de *Cri du chat* são exemplos de quando o ganho ou perda de cromossomos completos ou segmentos extensos tem consequências fenotípicas severas (LUPSKI, 2007).

Em um nível mais sutil, o número de cópias de varia entre indivíduos aparentemente saudáveis, o que implica um papel contributivo das CNVs na variação humana normal (INGELMAN-SUNDBERG et al., 2007; PERRY et al., 2007). Por outro lado, esta variação fenotípica tem sido associada à susceptibilidade a doenças devido ao fato das CNVs desempenharem papel funcional, seja em alterar a dosagem do gene, o nível de expressão, ou mesmo por interferir na transcrição gênica (PTACEK et al., 2008; STRANGER et al., 2007; WILLCOCKS; SMITH; CLATWORTHY, 2009; WU et al., 2008). Os efeitos genômicos dessas variantes dependem da quantidade de cópias que são encontradas e da sua posição relativa nos genes ou nos elementos reguladores (WAIN; TOBIN, 2011). Por conseguinte, a variação quantitativa na dosagem gênica pode antecipar a sua contribuição para a variabilidade do risco na etiologia das doenças complexas entre os indivíduos (LAU; YIN; MOK, 2006) (VRIJENHOEK et al., 2008; YU et al., 2011).

Nos últimos anos, várias CNVs presentes no genoma humano tem sido associadas com doenças genéticas complexas, incluindo câncer (DISKIN et al., 2009; JACOB, K. et al., 2009), diabetes (GRAYSON et al., 2010), obesidade (BOCHUKOVA et al., 2010; WALTERS et al., 2010), infecção por HIV (GONZALEZ et al., 2005), doenças neurodegenerativas, como o autismo (SEBAT, 2007) e esquizofrenia (IKEDA et al., 2010) e doenças autoimunes, tais como glomerulonefrite (AITMAN et al., 2006), psoríase (HOLLOX et al., 2007) e lúpus eritematoso sistêmico (YANG, Y. et al., 2007).

LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O LÚPUS

O Lúpus é uma doença genética complexa, caracterizada por uma resposta autoimune dirigida à antígenos nucleares e pela deposição de complexos imunes em diferentes tecidos (PTACEK et al., 2008). Isto resulta em uma inflamação local ou sistêmica, que muitas vezes evolui para disfunção ou mesmo para a falência dos órgãos (LAU et al., 2006).

O fenótipo da doença é extremamente heterogêneo, mesmo entre indivíduos aparentados. Existem evidências que demonstram o envolvimento tanto de fatores genéticos quanto ambientais, embora a etiologia da doença e os mecanismos de patogênese não tenham sido completamente elucidados (SANCHEZ et al., 2011; SARZI-PUTTINI et al., 2005).

O lúpus que apresenta quatro tipos principais: Lúpus Eritematoso Neonatal (LEN), Lúpus Induzido por Drogas (LID), Lúpus Eritematoso Discoide (LED) e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (MAIDHOF; HILAS, 2012). O último é a forma mais comum e, portanto, o enfoque do trabalho. O LES diferencia-se de outras formas pelos seus efeitos multissistêmicos. É uma das doenças autoimunes mais heterogêneas. Há produção de uma variedade de autoanticorpos e a evolução da doença provoca manifestações clínicas polimórficas, com períodos de exacerbações e remissões (PONS-ESTEL et al., 2010).

ETIOLOGIA

O sistema imune representa a principal barreira do hospedeiro contra as infecções, e tem a capacidade distinguir o próprio do não próprio de modo a tolerar os autoantígenos e responder a antígenos estranhos (LETTRE; RIOUX, 2008). A tolerância é um estado imunológico de não responsividade ao próprio. Uma falha nos mecanismos normais de autotolerância resulta em reações contra as células e tecidos saudáveis do próprio organismo, que são

chamadas de autoimunidade. Tais falhas podem ser causadas por defeitos no mecanismo de deleção clonal ou na regulação de linfócitos Th1 e Th2, perda da anergia da célula T, ativação policlonal de linfócitos, reação cruzada entre antígenos próprios e microbianos, entre outros (GUERRA; VYSE; GRAHAM, 2012).

A resposta imune hiperativa contra os antígenos autólogos gera inflamação e danos teciduais e tem potencial para conduzir a um amplo espectro de doenças autoimunes (GLEICHER; BARAD, 2007).

Acredita-se que fatores genéticos e ambientais são como gatilhos para a progressão de autoimunidade inofensiva para uma doença autoimune. Adicionalmente, o sexo parece ser um determinante importante visto que 75-80% dos pacientes que sofrem de doenças autoimunes são mulheres (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012).

O envolvimento multissistêmico é comumente observado em doenças autoimunes e os danos ao órgão-alvo principal geralmente conduz à apresentação clínica e caracteriza a doença (SATO, E.I., 2001). Devido aos estímulos para a resposta imune anormal serem difíceis ou impossíveis de eliminar e ao sistema imune possuir mecanismos de amplificação da resposta, uma vez que a resposta imune patológica comece, é difícil controlá-la ou terminá-la. Por tais razões, as doenças autoimunes tendem a ser crônicas e muitas vezes debilitantes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

As doenças autoimunes podem ser originadas por linfócitos T autorreativos, como no caso da diabetes tipo I e esclerose múltipla, ou por anticorpos. Estes, podem atuar contra células fixas e antígenos teciduais, como na anemia hemolítica e pênfigo vulgar, ou serem mediados por complexos imunes no caso do LES, e atingir, portanto mais tipos celulares, como antígenos nucleares e DNA (ABBAS et al., 2010).

Nesse contexto, a principal característica do LES é a formação de autoanticorpos que em combinação com antígenos, formam complexos imunes, levando, em última instância, à inflamação e ao dano tecidual (GUERRA et al., 2012).

O envolvimento imunológico no LES centra-se na perda da autotolerância. Em pacientes com LES o processo de fagocitose é comprometido, o que leva à remoção inadequada de células apoptóticas e de complexos imunes (DORNER; GIESECKE; LIPSKY, 2010).

Entretanto, o mecanismo etiológico do LES não está suficientemente esclarecido, pois além dos fatores imunológicos envolvidos, os fatores genéticos, hormonais e ambientais também desempenham papel importante no desenvolvimento da doença (YANG, M. L. et al., 2012).

Estudos sobre a potencial ligação entre a genética e LES têm mostrado uma predisposição dentro de famílias. Parentes em primeiro grau de pacientes com LES são significativamente mais susceptíveis a doença em comparação com o restante da população (MAIDHOF; HILAS, 2012). Adicionalmente, foram descobertas de variantes genéticas ligadas à expressão do LES. Em geral, a combinação destas variantes conduz às manifestações clínicas do LES (HARLEY et al., 2009).

O efeito dos hormônios na taxa de ocorrência e na severidade do LES também tem sido relevante. O mecanismo pelo qual os hormônios afetam a prevalência de LES em mulheres permanece desconhecido. Uma hipótese centra-se no papel da progesterona, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), prolactina e dos estrogênios na resposta do sistema imune (SARZI-PUTTINI et al., 2005).

Influências ambientais são claras, pois há exacerbação de alguns sintomas após exposição ao sol, infecção viral ou bacteriana e mudanças na atividade da doença após administração ou uso de algumas substâncias (MAIDHOF; HILAS, 2012). A luz ultravioleta estimula queratinócitos, o que leva à ativação de células B e produção de anticorpos, que pode induzir a atividade final das células T, resultando na produção de autoanticorpos adicionais (CASCIOLA-ROSEN; ANHALT; ROSEN, 1994; LEHMANN et al., 1990). O hábito de fumar, algumas drogas (procaïnâmica, hidralazina, minociclina, betabloqueadores, agentes anti-TNF), e até mesmo certos cosméticos são possíveis fatores que influenciam o desenvolvimento de lúpus (SATO, EMILIA INOUE et al., 2008).

PATOFISIOLOGIA

O LES é uma doença crônica que afeta vários órgãos por desencadear a formação de autoanticorpos e deposição complexos imunes em diferentes tecidos (GUERRA et al., 2012).

Acredita-se que o LES é desenvolvido quando linfócitos T autorreativos reconhecem antígenos próprios via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de uma célula apresentadora de antígeno (APC), levando à liberação de citocinas, inflamação e ativação de células B (RAVIRAJAN et al., 1998). As células B ativadas diferenciam-se em plasmócitos produtores de autoanticorpos, que causam danos teciduais em decorrência da sua formação e deposição na microvasculatura (DORNER et al., 2010; RAVIRAJAN et al., 1998)

Células B autorreativas produzem anticorpos contra antígenos expostos na superfície das células apoptóticas (BOUTS et al., 2012). Os autoantígenos que ativam as células T e células B em pacientes com LES podem ser atribuídos à eliminação inapropriada de células apoptóticas. Durante o processo de morte celular, fragmentos de material celular se formam na superfície da célula em apoptose, e apresentam-se na superfície celular. Consequentemente, esses resquícios celulares oferecem estímulo necessário para a ativação das células B autorreativas (MUNOZ et al., 2005).

Em resumo, a presença de células B autorreativas leva à produção de autoanticorpos, e em conjunto com a eliminação comprometida do material celular apoptótico, resulta na formação de complexos imunes. Na microvasculatura, estes complexos induzem reações autoimunes, causando a inflamação de inúmeros tecidos e consequentes danos associados ao LES (MAIDHOF; HILAS, 2012).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O LES é uma doença crônica que evolui apresentando períodos de atividade e remissão. Os pacientes apresentam grande variedade de manifestações clínicas devido ao comprometimento de múltiplos órgãos que ocorre de forma simultânea ou sequencial (LAU et al., 2006). Sinais e sintomas gerais incluem febre, fadiga, perda de peso, erupções cutâneas, artrite, nefrite, anemia e comprometimento do sistema nervoso central (Tabela 1) (SATO, EMILIA INOUE et al., 2008). Apesar de algumas manifestações clínicas serem comuns no LES, cada paciente apresenta um conjunto único de identificadores, devido à heterogeneidade da doença (PONS-ESTEL et al., 2010).

Tabela 1. Frequência das manifestações clínicas no Lúpus Eritematoso Sistêmico

Manifestações clínicas	Canadá <i>n</i> = 750	Europa <i>n</i> = 1000	EUA <i>n</i> = 464	Brasil <i>n</i> = 685
Artrite	63	84	91	82
Lesões cutâneas	78	-	55	51
Lesões mucosas	52	24	19	-
Pleuris	30	36	31	24
Comprometimento pulmonar	14	7	-	-
Pericardite	23	-	12	15
Fenômeno de Raynaud	60	34	24	49
Vasculite	56	-	-	51
Comprometimento renal	74	39	28	52
Azotemia	5	-	-	-
Comprometimento neurológico	53	27	11	13
Leucopenia/ Plaquetopenia	-	-	-	30/13
Linfadenomegalia	32	12	10	19

n corresponde ao número de indivíduos que entraram na estimativa

Adaptado de Sato et al., 2008.

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de LES é baseado em sinais e sintomas observados nos pacientes e em testes laboratoriais. Na prática, são utilizados os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 (TAN et al., 1982), e revisados em 1997 (HOCHBERG, M.C., 1997). A presença de quatro das onze manifestações clínico-laboratoriais é obrigatória para definir o diagnóstico da doença (Tabela 2) (BORBA et al., 2008). Os testes laboratoriais incluem a titulação de anticorpos antinucleares (ANAs) e dos autoanticorpos Anti-dsDNA e anti-Smith (Sm) (MAIDHOF; HILAS, 2012).

Tabela 2. Critérios do *American College of Rheumatology* para o diagnóstico de LES.

-
1. Eritema malar
 2. Lesão Discóide
 3. Fossensibilidade
 4. Úlceras orais/ nasais
 5. Artrite não erosiva
 6. Serosite (pleurite/ pericardite)
 7. Comprometimento renal (proteinúria persistente/ cilindrúria anormal)
 8. Distúrbios neurológicos (convulsões/ psicoses)
 9. Alterações hematológicas (anemia hemolítica/ leucopenia/ linfopenia/ plaquetopenia)
 10. Alterações imunológicas (anticorpos para antígenos nucleares/ anti-dsDNA/ antifosfolídeos)
 11. Anticorpos antinucleares
-

Adaptado de Borba et al., 2007.

EPIDEMIOLOGIA

A incidência de LES varia entre sexo, idade e ancestralidade. A prevalência na população geral é de aproximadamente 20 a 150 casos a cada 100.000 pessoas (MAIDHOF; HILAS, 2012).

O LES é mais comum em mulheres, principalmente em idade fértil. As estimativas apontam que LES acomete dez mulheres para cada homem afetado (SATO, EMILIA INOUE et al., 2008). Este aumento da incidência pode ser atribuído ao hormônio estrogênio. Estudos têm demonstrado que

mulheres que tiveram menarca precoce, que usaram contraceptivos orais ou terapias hormonais apresentam um risco aumentado (COSTENBADER et al., 2007).

O risco em homens é semelhante ao de mulheres na pré-puberdade ou na pós-menopausa. A síndrome de Klinefelter, em que os homens possuem um cromossomo X extra, está ligada a uma incidência mais elevada de LES, fornecendo subsídios para a associação entre LES e a patogênese hormonal (SCOFIELD et al., 2008).

O LES tem distribuição global. Todavia, determinados grupos étnicos são mais susceptíveis a desenvolver esta condição. Em geral, as evidências sugerem que o LES é mais comum em afro-americanos, hispânicos, afro-caribenhos, índios nativos norte-americanos, orientais, incluindo indianos e chineses, do que em populações caucasianas (CLEMENS; SIITERI; STITES, 1979; COFFMAN; LEBMAN; ROTHMAN, 1993; HOCHBERG, M. C., 1987).

Além disso, a apresentação e o curso do LES são altamente variáveis entre os indivíduos de ancestralidade diferentes. Acredita-se que a doença seja mais grave entre os afro-americanos e orientais do que em caucasianos (LAU et al., 2006).

BASE GENÉTICA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Evidências demonstram o envolvimento de fatores genéticos, embora a etiologia e os mecanismos da patogênese do LES não tenham sido completamente elucidados (AHMAD; BRUCE, 2001; SANCHEZ et al., 2011; SARZI-PUTTINI et al., 2005). Relatos que confirmam a relação do risco elevado de irmãos desenvolverem LES (ARDOIN; PISETSKY, 2008; MUSONE et al., 2008), a alta herdabilidade (>66%) e as maiores taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos (20-40%) do que entre gêmeos dizigóticos e outros irmãos completos (2-5%), sugerem que o LES possui uma base genética complexa (ALARCON-SEGOVIA et al., 2005)

Nas décadas de 1990 e 2000, os genes de risco de LES foram investigados por meio de estudos de ligação que levaram à identificação do *FCGR2A*, *FCGR3A* e *PDCD1* como candidatos (EDBERG et al., 2002; MOSER et al., 1998; PROKUNINA et al., 2002). No entanto, esses estudos limitaram-se à capacidade de identificar alelos causais e tinham baixo poder para mapear as variantes com pequeno efeito fenotípico, o que impediu o mapeamento completo do genoma (HARLEY et al., 2009).

Nos últimos anos, o aumento do conhecimento da estrutura do genoma humano e desenvolvimento tecnológico resultaram na disponibilidade de conjuntos de marcadores de alta densidade (MCCARTHY et al., 2008). Dessa forma, tornou-se possível desenvolver estudos de associação genômica em larga escala (GWAS), com capacidade para rastrear milhares de *SNPs* em todo o genoma, sem conhecimento prévio de genes ou de regiões candidatas (CERVINO; TSINOREMAS; HOFFMAN, 2007). Atualmente, com o progresso realizado pela utilização dos recursos de alta densidade de genotipagem, existem mais de 30 *loci* identificados que mostram a associação robusta com LES (GUERRA et al., 2012; HARLEY et al., 2009) (Figura 2).

Adicionalmente, avaliou-se a contribuição dos *loci* previamente identificados para a heterogeneidade clínica no lúpus. Foram encontradas associações significativas entre as manifestações clínicas do LES e cinco *loci*. A doença renal foi correlacionada significativamente com o alelo de risco no gene *ITGAM* e em *TNFSF*. Outros achados significativos incluem a associação entre alelos de risco em *FCGR2A* e rash malar, gene *ITGAM* e erupção cutânea discóide, *STAT4* e proteção contra úlceras orais e *IL21* e alterações hematológicas (SANCHEZ et al., 2011). Os resultados sugerem que o perfil genético pode ser uma ferramenta útil para prever as manifestações clínicas da doença em pacientes com lúpus no futuro.

Figura 2. Paralelo entre as descobertas genéticas e a determinação de genes em associação com LES (Adaptado de KAISER; CRISWELL, 2010).

Há evidências crescentes de que outros tipos de variação genética, como as CNVs, são importantes para a complexidade da doença, algumas das quais só foram incluídas recentemente nos painéis de genotipagem por GWAS (GUERRA et al., 2012; HARLEY et al., 2009).

As pesquisas realizadas com CNVs e LES até o presente momento avaliaram variantes pontuais (MORRIS et al., 2010; PTACEK et al., 2008). Estudos independentes relataram, principalmente, CNVs nos genes *FCGR3B* (MCKINNEY et al., 2010), *C4* (YANG, Y. et al., 2007) e nas interleucinas *IL-17F*, *IL-21* e *IL-22* (YU et al., 2011). A redução no número de cópias de *FCGR3B* e *C4* é considerada fator de risco para desenvolvimento do LES (WU

et al., 2008; Robinson, 2012 #141), enquanto o aumento do número de cópias das interleucinas *IL-17F*, *IL-21* e *IL-22* proporciona o mesmo efeito (YU et al., 2011). Entretanto, o perfil de *CNVs* em pacientes com LES permanece desconhecido, visto que a abordagem de triagem de *CNVs* em larga escala ainda não foi aplicada à doença.

Por conseguinte, cada associação recém-identificada apresenta novos desafios. Encontrar as variantes causais, entender como elas afetam a patofisiologia da doença e estabelecer sua contribuição para a susceptibilidade a LES permanece, em grande parte, inexplorada (SANCHEZ et al., 2011).

JUSTIFICATIVA

Embora tenha ocorrido um progresso notável tanto em ensaios iniciais de GWAS como também em estudos de genes alvo do LES, ainda existem lacunas significativas na compreensão da base genética da doença.

A identificação recente de *CNVs* comuns no genoma humano como fonte de variação genética pode explicar, em parte, a susceptibilidade à autoimunidade (BRONSTAD, INGEBORG et al., 2011).

Os estudos atuais com *CNVs* e LES englobam a análise pontual das variantes (MORRIS et al., 2010; YU et al., 2011). Dessa forma, o delineamento do perfil da variação no número de cópias para LES torna-se necessário. Como não foi feita uma análise em larga escala sobre o padrão de *CNVs* e LES, pouco é relatado se serão encontradas *CNVs* comuns que se associam com LES, ou se indivíduos afetados possuirão *CNVs* mais raras, tal como observado na análise de *CNVs* em larga escala de doenças como a esclerose lateral aminotrófica (BLAUW et al., 2008) e esquizofrenia (VRIJENHOEK et al., 2008).

Com o intuito de compreender a relação entre as *CNVs* e o risco para desenvolver LES, nós propusemos um estudo que possibilitasse a varredura completa do genoma, por meio de ensaios de microarranjo, os quais apresentam alta capacidade de identificação das variantes.

Além da importância teórica, esta pesquisa torna-se pioneira na análise em larga escala das *CNVs* em pacientes com LES.

HIPÓTESE

A literatura sobre *CNVs* tem demonstrado a sua importância, sobretudo em condições patológicas. Baseando-se nos achados disponíveis até o momento, supomos que o perfil de *CNVs* identificadas nos pacientes portadores de LES será distinto daquele descrito para os indivíduos saudáveis. Dessa forma, por meio da avaliação da relevância funcional, serão descritas as regiões de *CNVs* primordiais na relação com LES. Adicionalmente, como será aplicada uma tecnologia de alta resolução, serão eventualmente identificadas *CNVs* que ainda não foram descritas anteriormente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral promover análise em larga escala da distribuição de *CNVs* em amostra de pacientes portadores de LES.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar *CNVs* em pacientes com LES por meio da utilização da técnica de hibridação genômica em *arrays* (*aGH*) com *chips* de DNA de alta densidade;
2. Delinear o perfil de *CNVs* encontrado no conjunto amostral e compará-lo com a literatura;
3. Determinar o padrão de recorrência de *CNVs* na amostra estudada e categorizá-las em regiões de *CNVs* (*CNVRs*);
4. Identificar possíveis novas *CNVs* no conjunto amostral por meio da comparação das *CNVs* detectadas nos pacientes com LES com bancos de dados de variação estrutural do genoma.

MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL

A ideia inicial deste trabalho consistia em comparar frequências de marcadores genéticos moleculares em um grupo de pacientes portadores de LES com um grupo controle correspondente. Da consulta aos dados existentes, surgiram as CNVs como marcadores possivelmente relacionados a LES e eventualmente também ligadas a distúrbios autoimunes.

A metodologia aqui empregada, de descrição relativamente recente, com a possibilidade de estudo, em um só *chip* de DNA, de 2,6 milhões de sondas dirigidas a este tipo de variação, bem como a de detectar 750 mil *SNPs*, demonstrou-se a mais indicada para atingir os objetivos propostos.

A novidade do tema e da técnica, que demandavam uma complexa implantação laboratorial, determinaram a readequação do tamanho amostral para 24 amostras de pacientes e sua comparação com dados da literatura sobre indivíduos normais. Nesse sentido, o perfil de CNVs em pacientes portadores de LES foi analisado por meio de ensaio de hibridação genômica em *arrays* (*aGH*). A detecção de CNVs foi realizada com a utilização da plataforma *Affymetrix GeneChip System® Cytoscan HD™*. A leitura dos *chips* foi feita pelo *software Chromosome Analysis Suite (ChAS)*. O modelo de referência de *microarrays* que contem 380 amostras do projeto *HapMap* foi utilizado como base para comparação com as amostras de pacientes processadas. A determinação do padrão de CNVs para o grupo de pacientes incluiu identificar as CNVs comuns, raras e eventualmente novas.

COLABORADORES

As amostras de pacientes portadores de LES foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi da Divisão de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

A técnica de *aGH* foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP (Campinas, SP), sob a colaboração da Profa. Dra. Vera Lúcia Gil Lopes e da pós-doutoranda Profa. Dra. Milena Simioni.

As etapas finais da técnica de *aGH* (lavagem, marcação e escaneamento dos *chips*) foram realizadas no Laboratório de Microarranjos do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, SP.

CASUÍSTICA

Foram utilizadas 24 amostras de pacientes portadores de LES. Tais amostras foram anteriormente coletadas, mediante consentimento prévio, de pacientes não aparentados, atendidos e diagnosticados no ambulatório de Colagenoses da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP, USP) para o projeto de pesquisa “*Estudo da Neutropenia em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico*”, sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi e do pós-graduando João Alexandre Três Pancoto. O DNA de tais amostras se encontrava extraído, uma vez que estas foram utilizadas em outros projetos já executados, todos previamente aprovados por Comissão de Ética (ver item Aspectos Éticos).

Critérios de Seleção das amostras

Os critérios de inclusão para a seleção das 24 amostras dos pacientes acometidos com LES foram os seguintes:

1º critério: Presença de nefrite lúpica;

2º critério: Lesões cutâneas;

3º critério: Algum tipo de infecção;

4º critério: Manifestações neurológicas.

A amostra do projeto citado totaliza 185 indivíduos, dos quais foram selecionados seis homens e 18 mulheres. Todos os pacientes atenderam aos dois primeiros critérios de inclusão. O 3º critério não foi atendido por apenas um dos pacientes do sexo masculino. O 4º critério foi atendido por todas as mulheres e nenhum homem (Apêndice 1).

ASPECTOS ÉTICOS

As amostras provenientes de pacientes portadores de LES pertencem ao Banco de Amostras do Núcleo de Pesquisa em Imunogenética (BANPI) sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCMRP-USP sob o processo nº 7581/2007.

O projeto para elaboração do presente trabalho: "CNVs em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP, sob o processo nº 72493/2012 (Apêndice 2).

ANÁLISE LABORATORIAL

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES

Reagentes e soluções:

Água ultrapura esterilizada

EDTA 10% pH 8,0: etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O.

Tampão para lise de eritrócitos (lise I): Tris/HCl 0,01M pH 7,5; Sacarose 0,32M; MgCl₂ 5,0 mM; Triton X-100 1%; H₂O qsq para 1L.

Tampão para lise de leucócitos (lise II): NaCl 0,075M; NaEDTA 0,024M; 125 µL de SDS 10%; 1,1 mL de NaClO₄ 5M; H₂O qsq para 1L.

Cloreto de Sódio (NaCl): concentração 6M.

Isopropanol 100%

Etanol 75%

Procedimento:

O DNA das amostras de sangue dos pacientes de LES foi extraído de acordo com o protocolo de *salting-out* detalhado a seguir (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

Cerca de 10 mL de sangue foi coletado em tubo contendo EDTA como anticoagulante. O sangue foi transferido para um tubo de 50 mL e adicionado 40 mL tampão de lise I gelado. Misturou-se delicadamente o conteúdo do tubo por inversão e centrifugaram-se os tubos por dez minutos a 3300 rpm a 4°C.

O sobrenadante (hemácias lisadas) foi descartado cuidadosamente e a extração prosseguiu com o *pellet* de células retido no fundo do tubo. O *pellet* de células foi ressuspenso em 4,5 mL de tampão de lise II. A mistura foi agitada em um *Vortex* por dez segundos a temperatura ambiente.

Adicionou-se 2 mL de NaCl 6M saturado por lisar as proteínas presentes. Agitou-se no *Vortex* por 15 segundos a temperatura ambiente.

Centrifugou-se o tubo por dez minutos a 3300 rpm. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de isopropanol absoluto ao sobrenadante no tubo e homogeneizou-se gentilmente até que o DNA precipitasse.

O DNA foi retirado com auxílio de uma pipeta esterilizada e colocado em tubo de 1,5 mL (do tipo Eppendorf) contendo 1 mL de etanol 75% gelado. O tubo foi centrifugado por dez minutos a 4°C e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O tubo foi colocado em uma centrífuga a vácuo por dez minutos para que o restante do etanol fosse removido. O DNA no fundo do tubo foi dissolvido em 400 µL de água esterilizada e armazenado em refrigerador com temperatura aproximada de -4°C.

AValiação da integridade do DNA

Com o intuito de avaliar se o material genético apresentava-se íntegro, sem indícios de degradação do DNA, foi feita eletroforese em gel de agarose. Para verificar se a concentração e os graus de pureza do DNA seriam suficientes

para conduzir os experimentos seguintes, o material foi quantificado em espectrofotômetro. O procedimento padrão para ambas as metodologias está descrito a seguir.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Reagentes e soluções:

Agarose

Sybr Green

Tampão TBE 1X (0,9M) pH 8,0: 1,08g de Tris (PM=121,1); 0,53g de ácido bórico; 4 mL de solução de EDTA; H₂O qsp 1L.

Tampão de amostra (Loading Buffer)

Procedimento:

Inicialmente, 1 g de agarose foi misturada com 100 mL de Tampão TBE 1X, para a obtenção de um gel de agarose 1%. A mistura foi levada ao forno micro-ondas até que ficasse homogênea. Adicionou-se 14 µL de corante Sybr Green. O conteúdo foi derramado em uma cubeta com pentes posicionados para formarem os poços do gel e esperou-se a mistura solidificar. Logo, o suporte com o gel foi levado à cuba de eletroforese e tampão TBE 1X foi adicionado até cobrir a superfície do gel. Em seguida, 4 µL da amostra de DNA foi homogeneizada com 4 µL de tampão de corrida e aplicada nos poços do gel. A corrida eletroforética ocorreu com voltagem ajustada para 80V por 30 minutos. O gel foi analisado sob radiação ultravioleta (UV), e registrado pela câmera acoplada ao visualizador.

QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Tampão TE Low EDTA

Procedimento:

O DNA foi quantificado no espectrofotômetro de microplacas Epoch™ (BioTeK®). O espectro de leitura de comprimentos de onda tem cobertura de 200 a 999 nm. A quantidade de 1 µL de cada amostra é pipetada na microplaca e a Densidade Óptica (DO) é lida no espectrofotômetro. Os valores

de concentração e pureza do DNA são gerados por meio da interface do *software* Gen5, acoplado ao Epoch™. Os padrões de pureza adequados devem possuir as razões de absorbância entre:

A260/A280: 1,7 - 2,0

A260/A230: >1,1

Em seguida, as amostras foram diluídas em tampão TE com EDTA, até a concentração de 50 ng/μL. Para verificar se a concentração atingiu o valor esperado, as amostras foram quantificadas novamente no espectrofotômetro.

DETECÇÃO DE CNVs: HIBRIDAÇÃO GENÔMICA EM ARRAYS

As CNVs foram detectadas por meio da técnica de hibridação genômica em *arrays* (aGH), utilizando a plataforma *GeneChip System CytoScan HD™* (Affymetrix®) e o kit de reagentes compatível, seguindo as recomendações do fabricante (código do produto: 901835). O *chip CytoScan HD™* contém sondas de oligonucleotídeos com poder para detecção de alterações estruturais, com ampla cobertura do genoma, com capacidade para identificar aproximadamente 2,6 milhões de CNVs e 750 mil SNPs.

As 24 amostras foram processadas de acordo com o protocolo padrão do CytoScan HD (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). O ensaio consistiu nas etapas descritas a seguir.

DIGESTÃO DO DNA

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Água livre de nuclease

Tampão TE Low EDTA

BSA 100X: concentração inicial 10 μg/μL.

Enzima *NspI*

Tampão da *NspI* 10X: Tris-HCl 10 mM; NaCl 50 mM ; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM.

Procedimento:

Inicialmente, 5 μL do DNA a 50 ng/ μL foram adicionados aos poços correspondentes de uma placa de 96 poços. Como controle positivo foi utilizado 5 μL do DNA fornecido no *kit* e como controle negativo, 5 μL de Tampão TE Low EDTA. Em seguida, a mistura da digestão foi preparada em um tubo de 1,5 mL contendo todos os reagentes: 11,55 μL de água livre de nuclease; 0,2 μL de BSA 100X; 2,0 μL de tampão da *NspI* 10X; 1,0 μL enzima *NspI* (quantidades para uma reação).

A mistura foi colocada no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuída igualmente em tubos conectados (*strip*). Com o auxílio de uma pipeta multicanal 14,75 μL foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços. A placa foi selada, colocada no *Vortex* uma vez em alta velocidade e centrifugada a 2000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo.

Programa CytoScan Digest:

37°C por 2 horas;
65°C por 20 minutos;
4°C indefinidamente.

LIGAÇÃO AOS ADAPTADORESReagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Adaptador, *NspI*: concentração 50 μM .

Enzima T4 DNA Ligase

Tampão da T4 DNA Ligase 10X: Tris-HCl (pH 7.6) 660 mM; MgCl_2 66 mM; DTT 100 mM; ATP 660 μM .

Procedimento:

Os fragmentos de DNA anteriormente digeridos pela enzima *NspI* apresentam, independente do tamanho, extremidades livres de 4 pb de comprimento. Nesta etapa, adaptadores específicos são ligados a essas extremidades. Para que a reação ocorresse, a mistura da ligação foi preparada em um tubo de 1,5 mL contendo todos os reagentes: 0,75 μL de

adaptador *NspI*; 2,5 μ L tampão da T4 DNA Ligase 10X; 2,0 μ L enzima T4 DNA Ligase (quantidades para uma reação).

Em seguida, a mistura foi colocada no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuída igualmente em tubos conectados (*strip*). Com o auxílio de um pipeta multicanal 5,25 μ L foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços. A placa foi selada, colocada no *Vortex* uma vez em alta velocidade, e centrifugada a 2000 rpm durante 1 minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo.

Programa CytoScan Ligate:

16°C por 3 horas;
70°C por 20 minutos;
4°C indefinidamente.

AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR PCR

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Água livre de nuclease

Reagente GC-Melt

dNTP: concentração 2,5 mM de cada ácido nucleico.

PCR Primer 002

Clontech Takara Bio, Mountain View, CA, USA:

Enzima Taq DNA Polimerase TITANIUM™ 50X: Glicerol 1% 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) 0,4 mM; KCl 2 mM; EDTA (pH 8,0) 2,0 μ M; Tween-20: 0,005%; Nonidet P-40: 0,005%.

Tampão da Taq TITANIUM™ 10X: Tricina-KOH (pH 8,0) 40 mM; KCl 16 mM; MgCl₂ 3,5 mM; BSA 3,75 μ g/ml.

Procedimento:

Inicialmente, a placa contendo as amostras foi centrifugada a 2000 rpm durante um minuto. As amostras foram diluídas em 75 μ L de água livre de nuclease. A placa foi devidamente selada e colocada no *Vortex* duas vezes e centrifugada novamente nas condições similares às citadas anteriormente. Quatro alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram transferidas para outra placa de PCR.

Em seguida, a mistura da ligação foi preparada em um tubo de 50 mL contendo todos os reagentes: 39,5 µL de água livre de nuclease; 20,0 µL de reagente GC-Melt; 14,0 µL de dNTP; 4,5 µL de iniciador (PCR Primer 002); 10,0 µL tampão da *Taq* TITTANIUM™ 50X; 2,0 µL enzima *Taq* DNA Polimerase TITTANIUM™ (quantidades para uma reação).

A mistura foi colocada no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuída em um reservatório. Com o auxílio de um pipeta multicanal 90 µL foram adicionado aos poços das amostras. A placa foi selada, colocada no *Vortex* duas vezes em alta velocidade, e centrifugada a 2000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo. As condições da PCR foram otimizadas pelo fabricante para amplificar preferencialmente fragmentos entre 150 e 2000 pb.

Programa CytoScan PCR:

94°C por 3 minutos;
94°C por 30 segundos;
60°C por 45 segundos;
68°C por 15 segundos;
68°C por 7 minutos;
4°C indefinidamente.

1º Ponto de Checagem

Para checar se as etapas de digestão, ligação e amplificação do material ocorreram de forma correta, foi feita eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR. Foi utilizado tampão de amostra (*Lodding Dye*) *USB RapidRun*™ 5X e marcador (*ladder*) *USB 50-2000 pb*. Como as condições da PCR foram otimizadas para amplificar fragmentos entre 150 e 2000 pb, o padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder a esse intervalo, como mostrado na Figura 3.

Figura 3. Padrão de bandas do gel de agarose 2% dos produtos amplificados da PCR. A maioria do material deve estar entre 150 e 2000 pb.

PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Purification Beads

Tampão de lavagem (Purification Wash Buffer)

Tampão de eluição (Elution Buffer)

Procedimento:

Os quatro produtos da PCR de cada amostra foram transferidos para tubos (tipo Eppendorf Safe-Lock) de 1,5 mL correspondentes. Foram adicionados 720 μ L do reagente *Purification Beads* em cada amostra. Cada tubo foi tampado, misturado por inversão e incubado a temperatura ambiente durante dez minutos.

Os tubos foram centrifugados a 16100 rcf durante três minutos e transferidos para um suporte magnético (MagnaRack™ Life Technologies). Deixando os tubos no suporte, o sobrenadante foi retirado e descartado, com auxílio de uma pipeta, sem que tocasse o precipitado.

Em seguida, 1,0 mL do tampão de lavagem foi adicionado a cada amostra. Os tubos foram tampados, e levados ao *Vortex* na velocidade máxima durante dois minutos. Centrifugou-se a 16100 rcf durante três minutos com

as dobradiças dos tubos voltadas para fora na centrífuga. Os tubos foram levados de volta ao suporte magnético. Novamente o sobrenadante foi retirado e descartado, com auxílio de uma pipeta, sem que tocasse o precipitado. Centrifugou-se a 16100 rcf durante 30 segundos e quaisquer gotas do tampão de lavagem restantes foi removida do fundo do tubo com o auxílio de uma pipeta. Os tubos foram tirados do suporte magnético e deixados destampados durante dez minutos em temperatura ambiente, para assegurar que qualquer resíduo restante evaporasse.

Adicionou-se 52 μL do tampão de eluição nas amostras. Os tubos foram tampados, colocados dentro de um adaptador de espuma e levados ao *Vortex* na velocidade máxima durante dez minutos para ressuspender o material aderido às *Beads* magnéticas. Centrifugou-se a 16100 rcf durante três minutos com as dobradiças dos tubos voltadas para fora na centrífuga. Os tubos foram colocados no suporte magnético por dez minutos, até que todas as *Beads* magnéticas aderissem a parede do tubo.

O volume de 47 μL da amostra eluída foi transferido para o poço correspondente de uma placa de 96 poços. A placa foi devidamente selada, levada ao *Vortex* uma vez em alta velocidade, e centrifugada a 2000 rpm durante um minuto.

2º Ponto de Checagem:

Para certificar que a purificação dos produtos da PCR garantiu condições ideais para o prosseguimento dos experimentos foi feita quantificação do DNA. Na avaliação das leituras de DO, os padrões atingidos devem ser:

Concentração: $\geq 2500 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Pureza: Razão A260/A280: 1,8 e 2,0

Medição A320: $< 0,1$

FRAGMENTAÇÃO

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Água livre de nuclease

Reagente de fragmentação

Tampão de fragmentação (Fragmentation Buffer)

Procedimento:

Inicialmente, a placa contendo o produto purificado foi levada ao *Vortex* uma vez em alta velocidade e colocada sobre o bloco de refrigeração em gelo, onde permaneceu durante essa etapa.

Em seguida, a mistura da fragmentação foi preparada em um tubo de 1,5 mL contendo todos os reagentes: 122,4 μ L de água livre de nuclease; 7,2 μ L de reagente de fragmentação; 158,4 μ L de tampão de fragmentação (quantidades para oito reações).

A mistura foi colocado no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuído igualmente em tubos conectados (*strip*). Com o auxílio de um pipeta multicanal, adicionou-se 10,0 μ L aos poços de um placa de 96 poços. A placa foi selada, colocada no *Vortex* uma vez em alta velocidade e depois em uma centrífuga pré-refrigerada (4°C) a 2000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo.

Programa CytoScan Fragment:

37°C por 35 minutos;

95°C por 15 minutos;

4°C indefinidamente.

3º Ponto de Checagem

Para checar se a fragmentação ocorreu de forma esperada, foi feita eletroforese em gel de agarose 4% do produto fragmentado. Foi utilizado tampão de amostra (*Lodding Dye*) *USB RapidRun™ 5X* e marcador (*ladder*) *TrackIt™ 25 pb*. O padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder

ao intervalo de 25 a 125 pb para confirmar que houve a fragmentação, como mostrado na Figura 4.

Figura 4. Padrão de bandas do gel de agarose 4% dos produtos fragmentados. A maioria do material deve estar entre 25 e 125 pb.

PRÉ-MARCAÇÃO

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Reagente de marcação do DNA: concentração 30 mM.

Enzima *TdT*

Tampão da *TdT* 5X: Ácido cacodílico (pH 6,8) 500mM; CoCl₂ 5mM; DTT 0,5mM.

Procedimento:

A placa contendo o produto purificado foi levada ao *Vortex* uma vez em alta velocidade, e colocada sobre o bloco de refrigeração em gelo, onde permaneceu durante essa etapa.

Em seguida, a mistura da marcação foi preparada em um tubo de 1,5 mL contendo todos os reagentes: 2,0 µL de reagente de marcação do DNA; 14,0 µL de tampão da *TdT* 5X; 3,5 µL de enzima *TdT* (quantidades para uma reação).

A mistura foi colocada no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuída igualmente em tubos conectados (*strip*). Com o auxílio de um pipeta multicanal 19,5 µL foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços. A placa foi selada, colocada no *Vortex* uma vez em alta velocidade e depois em uma centrífuga pré-refrigerada (4°C) a 2000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo.

Programa CytoScan Label:

37°C por 4 horas;
95°C por 15 minutos;
4°C indefinidamente.

HIBRIDAÇÃO NOS CHIPS CYTOSCAN HD™

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Reagente Oligo Control 0100

Tampão de hibridação 1 (Hyb Buffer Part 1)

Tampão de hibridação 2 (Hyb Buffer Part 2)

Tampão de hibridação 3 (Hyb Buffer Part 3)

Tampão de hibridação 4 (Hyb Buffer Part 4)

Procedimento:

Nesta fase, cada amostra foi hibridada em um *chip CytoScan HD™* individual. Inicialmente, a mistura da hibridação foi preparada em um tubo de 15 mL contendo todos os reagentes: 165,0 µL de tampão de hibridação 1; 15,0 µL tampão de hibridação 2; 7,0 µL de tampão de hibridação 3; 1,0 µL de tampão de hibridação 4; 2,0 µL reagente Oligo Control 0100 (quantidades para uma reação).

A mistura foi colocada no *Vortex* três vezes em alta velocidade, e distribuído em um reservatório. Com o auxílio de um pipeta multicanal 190 µL foram adicionados aos poços das amostras. A placa foi selada, colocada no *Vortex* duas vezes em alta velocidade, e centrifugada a 2000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se o programa do termociclador listado abaixo.

Programa CytoScan Hyb:

95°C por 10 minutos;
49°C indefinidamente.

Em seguida, deixando as amostras no termociclador, adicionou-se 200 µL de amostra em cada *chip* individual. Antes dos *chips* serem vedados firmemente com adesivo, qualquer excesso de líquido em torno dos septos foi removido cuidadosamente. Imediatamente, os *chips* foram levados ao forno de hibridação (*GeneChip® Hybridization Oven 640*; Affymetrix Inc.), onde permaneceram por um período de 16 horas a 50°C e 60 rpm.

LAVAGEM E MARCAÇÃO

Reagentes e soluções:

Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA:

Tampão de lavagem A (Wash Buffer A)

Tampão de lavagem B (Wash Buffer B)

Tampão de coloração 1 (Stain Buffer 1)

Tampão de coloração 2 (Stain Buffer 2)

Tampão do *array* (Array Holding Buffer)

Procedimento:

Imediatamente após os *chips* serem retirados do forno de hibridação, o conteúdo no *chip* foi removido e substituído por 200 µL de tampão do *array* (Array Holding Buffer). Em seguida, os *chips* foram inseridos na estação de lavagem (*GeneChip® Fluidics Station 450*; Affymetrix Inc.), quatro de cada vez. Na estação de lavagem foram executados dois passos: a remoção do excesso de marcador e coloração. Para tal, dois recipientes contendo os tampões de lavagem A e B foram posicionados na parte lateral do equipamento. Os tampões de coloração 1 e 2 e o tampão do *array* foram aliquotados em respectivos tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL. Cada conjunto de três tubos contendo os reagentes citados correspondeu a um *chip* e foi posicionado na parte frontal da estação. O programa para execução automática das etapas de lavagem e coloração dos *chips* *CytoScan HD™* foi selecionado e teve duração de duas horas para cada conjunto de quatro *chips*.

ESCANEAMENTO

Procedimento:

O equipamento *GeneChip® Scanner 3000 7G* foi utilizado para gerar os resultados da varredura completa do genoma. São utilizados programas específicos para captação de imagem do *GeneChip CytoScan HD Array* analisado. A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização *GeneChip® Operating software (GCOS)* (Affymetrix®), no qual pode-se verificar o padrão das sondas controle do sistema, dispostas nas extremidades e no centro de cada *chip*, de forma a se comprovar que as condições de hibridação do microarranjo foram adequadas.

ANÁLISE DOS DADOS

DETERMINAÇÃO DE CNVS PELO SOFTWARE *ChAS*

O programa *GCOS* realiza a conversão da aglomeração das intensidades das sondas decorrentes do escaneamento dos *chips* em logaritmo. São gerados sete arquivos para cada amostra, dentre eles o arquivo com extensão *.CEL*, utilizado como *input* para a análise dos dados.

A determinação de *CNVs* a partir dos dados gerados por *microarray* é realizada pelo software *Chromosome Analysis Suite v.1.2.2 (ChAS)* (Affymetrix®). O *ChAS* calcula a presença de *CNVs* baseado em dez etapas sucessivas. A estimativa do número de cópias neste programa é feita pelo cálculo do algoritmo *Hidden Markov Model (HMM)*, enquanto que a determinação do sexo é feita pelo cálculo do algoritmo *Y-Gender*.

Os dados gerados na determinação de *CNVs* pelo *ChAS* foram visualizados na forma de gráficos e tabelas. Nos gráficos, são observados *log2 ratio*, o *weighted log2 ratio* e o *CNstate (CN)*. O CN refere-se ao número de cópias de cada segmento genômico. A cópia diploide normal é representada pelo $CN=2$, enquanto que $CN<2$ ($CN=0$ ou $CN=1$) corresponde a deleção e $CN>2$ ($CN=3$ ou $CN=4$) corresponde a duplicação de segmentos genômicos. O programa gera, para cada indivíduo, uma tabela na forma de arquivo com extensão *.txt*,

contendo informações relacionadas a cada CNV detectada, tais como: localização genômica exata (cromossomo, citobanda, posição inicial e final), o tamanho da CNV, os genes sobrepostos, total ou parcialmente, às CNVs e se estes estão presentes no OMIM® (*Online Mendelian Inheritance in Man*).

MODELO DE REFERÊNCIA DE POPULAÇÕES DO PROJETO HAPMAP

O arquivo modelo de referência do CytoScan HD™ (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) incluiu os dados de CNV de 380 indivíduos controles executados como parte de um conjunto de nove operadores que processaram aproximadamente 48 amostras únicas em duas rodadas cada, com randomização das amostras de DNA, reagentes e instrumentos utilizados.

A amostra de DNA consistiu em 284 amostras do projeto *HapMap* de três grupos étnicos distintos, contendo pelo menos uma réplica de cada uma das 270 amostras do *HapMap* (GIBBS et al., 2003): 90 africanos (Yoruba), 90 asiáticos e 90 caucasianos, derivadas de linhagens celulares pertencentes ao Instituto de Pesquisa Médica *Coriell* (Coriell Institute of Medical Research), e 96 amostras de DNA a partir de sangue de indivíduos saudáveis pertencentes a companhia *BioServe Biotechnologies* (BioServe, Beltsville, USA).

PADRÕES DE QUALIDADE DOS EXPERIMENTOS

Para avaliação da qualidade dos experimentos de *aGH*, três parâmetros recomendados pelo fabricante, que também fornece os valores de limiar, são estimados e indicam se os dados obtidos foram úteis para a análise do número de cópia (CN).

SNPQC

SNPQC (*Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*) é um parâmetro métrico que fornece informações sobre o nível global da qualidade dos dados a partir de uma perspectiva de *SNPs*. Esse indicador estima a distribuição dos alelos em homozigose (AA ou BB) e em heterozigose (AB), calculando a distância entre eles. Quanto melhor a separação dessas distribuições, melhor

é a capacidade de identificar o genótipo com base na sua posição no *cluster*. *Microarrays* com SNPQC ≥ 14 são considerados de alta qualidade.

MAPD

MAPD (*Median Absolute Pairwise Difference*) é a medida da variação de curto alcance do conjunto de sondas de *microarray* em todo o genoma. Esse parâmetro representa a mediana da distribuição das alterações no *log2 ratio* entre sondas adjacentes. Como o MAPD mede diferenças par a par entre sondas adjacentes os efeitos são medidos em curta distância no *microarray*. A variabilidade aumentada no *log2 ratio* diminui a qualidade da determinação do CN. *Microarrays* com MAPD $\leq 0,25$ são capazes de determinar o CN com clareza.

WavinessSD

WavinessSD (*Waviness Standard Deviation*) é a medida da variação de longo alcance do conjunto de sondas de *microarray* em todo o genoma. Esse parâmetro mede o desvio padrão do *log2 ratio* referente à extensão da faixa de variação em grandes segmentos. *Microarrays* com WavinessSD $\leq 0,12$ são considerados adequados.

ANÁLISE PADRÃO

Na detecção de CNVs pelo programa ChAS o número de marcadores necessários para definir as variantes foi limitado no mínimo de 25, no caso de deleção, e de 50, no caso de duplicação. Os limiares foram determinados de acordo com o que foi recomendado pela Affymetrix® como seguro na detecção de CNVs com pouco risco de resultados falso-positivos. A análise geral das CNVs seguiu tais limites especificados. Adicionalmente, as CNVs em que o programa utilizou os recursos *smoothed/joined* foram inspecionadas diretamente. Esses recursos podem ser definidos como:

Smoothed

Combina segmentos adjacentes que são ambos ganhos, mesmo que eles não tenham o mesmo CN state. Por exemplo, o *Smoothed* combina um conjunto de segmentos adjacentes com CN=3 com o de CN=4, considera os

dois como um só segmento e atribui o *CN state* mais prevalente. O mesmo acontece para deleção CN=0 e CN=1. O *Smoothed* não combina os ganhos com perdas ou com segmentos normais.

Joined

Combina segmentos de ganhos ou perdas se estes forem separados por intervalos pequenos dos segmentos com número de cópia normal (CN=2). Nesse recurso, se um segmento com CN=2 com menos de 25 marcadores estiver entre dois segmentos adjacentes com o mesmo CN, os fragmentos com número de cópia normal serão removidos, e os segmentos adjacentes serão unidos.

Foi realizada uma análise visual cuidadosa das CNVs em que foram detectados segmentos com *smoothed/joined* com o intuito de filtrar as CNVs com risco de serem falso-positivas e eliminá-las das análises subsequentes.

AVALIAÇÃO DAS CNVS DESCRITAS EM BANCOS DE DADOS

Para considerar se determinada CNV encontrada no conjunto amostral já havia sido descrita em bancos de dados de variantes estruturais, foi realizada uma busca pela região em que se encontrava a CNV em sua exata localização genômica nas seguintes bases:

- *Database of Genomic Variants* (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>): catálogo de CNVs encontradas em indivíduos saudáveis;
- *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>) / *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER, <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/DECIPHER/>): catálogo de CNVs com potencial patogênico;

- *International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* (ISCA, <https://www.iscaconsortium.org/>): catálogo de CNVs em regiões constitutivas do genoma.

Os casos em que não foram encontradas CNVs no mesmo sentido na região descrita em dos nenhum bancos de dados citados foram enquadrados na categoria "*CNVs não descritas em banco de dados*".

DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE RECORRÊNCIA DAS CNVs

Com o intuito de determinar se as CNVs foram de ocorrência única ou se estavam presentes em mais de um indivíduo analisado, considerou-se a localização genômica. As variantes agrupadas em "*CNVs únicas*" não apresentaram sobreposição com nenhuma outra CNVs identificada. Calculou-se a sobreposição das demais CNVs, e as CNVs compartilhadas, em parte ou absolutamente, foram agrupadas em regiões de CNVs (CNVRs). As CNVRs representam a região de CNVs que se sobrepõe entre os indivíduos, ou seja, se duas ou mais CNVs tem a mesma localização genômica, a totalidade do segmento variável é agrupado em CNVR (Figura 5).

Figura 5. Representação de uma região de CNV. Quatro CNVs sobrepostas são consideradas uma CNVR.

ANÁLISE DE REGIÕES ESPECÍFICAS: CYTOREGIONS

Na análise padrão, o número mínimo de marcadores foi delimitado. Entretanto, para os genes candidatos de interesse realizou-se uma análise

mais detalhada por meio da visualização de CNVs sem número restrito de marcadores. Para proceder com a referida análise utilizou-se a ferramenta *Cytoregions* do programa *ChAS* que permite a busca de regiões ou genes de interesse devidamente selecionados para compor determinada *Cytoregion*. Os genes que compuseram as listas foram escolhidos com base na literatura. O critério utilizado para a seleção foi a presença dos genes em estudos de ligação em famílias e GWAS relacionados com autoimunidade, isto é, se determinado gene apresentou marcadores em que um dos alelos foi associado com autoimunidade; e genes com dosagem alterada encontrados em CNVs relacionadas com fenótipos autoimunes. Desse modo, foram criadas três *Cytoregions*. A primeira e a segunda possuíam, respectivamente, genes previamente relacionados com LES e genes envolvidos com doenças autoimunes, exceto com LES. A terceira era composta por uma lista de genes encontrados em CNVs relacionadas com autoimunidade (Apêndice 3). Após a busca dos genes por meio das *Cytoregions* no *ChAS*, os dados gerados foram exportados para planilha *Microsoft Excel*.

RESULTADOS

QUALIDADE DOS EXPERIMENTOS DE *aGH*

Os 24 indivíduos portadores de LES foram analisados pela técnica de *aGH*. Após o processamento das amostras, verificou-se a qualidade dos experimentos.

Inicialmente, pelo programa GCOS (Affymetrix®), a imagem de leitura do escaneamento dos *chips* foi visualmente inspecionada. Constatou-se problema de hibridação em um *chip*, mas os demais apresentaram padrão visual dentro do esperado e pode-se verificar os controles positivos do sistema de forma a se comprovar que as condições de hibridação do microarranjo foram adequadas.

Em seguida, os três parâmetros de qualidade: *SNPQC*, *MAPD* e *WavinessSD* (v. pag. 47-48, Material e Métodos), estimados pelo programa *ChAS* (Tabela 3) indicaram que o *chip* em que foi constatado problemas de hibridação apresentou valores insuficientes em dois parâmetros (*SNPQC* e *MAPD*). Por tal razão, foi excluído das análises posteriores. Três outros *chips*, correspondentes aos pacientes 11, 17 e 18 mostraram valores (12, 13 e 13, respectivamente) pouco abaixo do limiar em relação ao *SNPQC* (≥ 14). Entretanto, esses não foram desconsiderados por se apresentarem dentro dos padrões para os outros parâmetros e valores de *log2 Ratio* adequados na apresentação gráfica pelo *ChAS*. Dessa forma, 23 *chips* foram processados na análise de *CNVs*.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade dos experimentos de *aGH*.

Paciente	<i>SNPQC</i> ≥ 14	<i>MAPD</i> $\leq 0,25$	<i>WavinessSD</i> $\leq 0,12$	Situação
1	20	0,189	0,094	Processado
2	15	0,180	0,078	Processado
3	18	0,203	0,094	Processado
4	16	0,191	0,078	Processado
5	19	0,176	0,101	Processado
6	20	0,192	0,086	Processado
7	16	0,183	0,087	Processado
8	14	0,190	0,086	Processado
9	15	0,187	0,080	Processado
10	16	0,179	0,076	Processado
11	12*	0,206	0,082	Processado
12	16	0,172	0,074	Processado
13	21	0,185	0,092	Processado
14	17	0,207	0,086	Processado
15	20	0,188	0,090	Processado
16	14	0,240	0,105	Processado
17	13*	0,218	0,089	Processado
18	13*	0,224	0,092	Processado
19	20	0,190	0,090	Processado
20	16	0,207	0,094	Processado
21	19	0,203	0,090	Processado
22	16	0,194	0,077	Processado
23	20	0,217	0,100	Processado
24	10*	0,259*	0,093	Excluído

(*) Valores abaixo do limiar para o determinado parâmetro.

ANÁLISE DAS CNVS

DISTRIBUIÇÃO DAS CNVS NA AMOSTRA DE PACIENTES COM LES

A análise de CNVs pelo programa *ChAS* nos 23 pacientes com LES identificou um total de 406 CNVs (Tabela 4; Apêndice 4), 311 das quais foram do tipo deleção (18 com CN=0 e 293 com CN=1) e 95 duplicações (82 com CN=3 e 13 com CN=4). A média de CNVs por pacientes correspondeu a 18.

Tabela 4. Distribuição de CNVs nos pacientes com LES.

Paciente	Sexo	Total de CNVs	Deleções		Duplicações	
			CN=0	CN=1	CN=3	CN=4
1	Masculino	17	1	9	7	0
2	Masculino	10	1	7	2	0
3	Masculino	18	1	14	3	0
4	Masculino	5	0	3	2	0
5	Masculino	51	2	43	6	0
6	Feminino	12	2	7	2	1
7	Feminino	15	0	12	2	1
8	Feminino	14	0	10	4	0
9	Feminino	11	0	6	5	0
10	Feminino	17	0	10	6	1
11	Feminino	20	1	12	6	1
12	Feminino	14	0	10	4	0
13	Feminino	17	1	13	2	1
14	Feminino	16	1	11	3	1
15	Feminino	14	1	11	1	1
16	Feminino	31	1	22	6	2
17	Feminino	13	1	6	5	1
18	Feminino	15	0	14	1	0
19	Feminino	23	2	19	2	0
20	Feminino	13	1	11	0	1
21	Feminino	21	0	16	3	2
22	Feminino	17	1	12	4	0
23	Feminino	22	1	15	6	0
Total		406	18	293	82	13

CN = Copy Number state; número de cópias do segmento genômico deletado ou duplicado.

DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS CNVS IDENTIFICADAS

As CNVs identificadas na amostra apresentaram tamanhos variados. A maioria delas enquadrou-se na faixa de tamanho entre 10 a 100 kb (Figura 6). Todos os pacientes apresentaram CNVs entre 10 a 450 kb (Tabela 5). Em

relação às grandes CNVs (maiores do que 450 kb), a maioria dos pacientes possui pelo menos uma CNV dessa especificação (Tabela 6). Entretanto, CNVs menores do que 1kb foram apresentadas por somente dois pacientes.

Figura 6. Gráfico mostrando a distribuição de tamanhos das CNVs nas amostras de LES.

Tabela 5. Distribuição das faixas de tamanho das CNVs encontradas nos pacientes.

Tamanho da CNV	Total de CNVs		Total de pacientes
<1kb	3	0,7%	2
1- 10 kb	62	15,3%	22
10- 100 kb	240	59,1%	Todos
100 - 450 kb	83	20,4%	Todos
> 450 kb	18	4,4%	16
Total	406		23

Tabela 6. Grandes CNVs (>450 kb) identificadas na amostra de pacientes com LES.

Localização Genômica	Início	Fim	Tamanho (kb)	Tipo	Genes	Pacientes	nº de CNVs
1q21.1	144086896	144567360	480	Duplicação	SRGAP2P2, LOC728855, LOC728875, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4A	23	1
11p11.12	50480770	51228126	747	Deleção		7	1
11p11.12	50344786	51267021	922	Deleção	LOC646813	5	1
12p12.1	21796951	22445614	648	Duplicação	LDHB, KCNJ8, ABCC9, CMAS, ST8SIA1	11	1
14q32.33	106274525	106728149	453	Duplicação	KIAA0125, ADAM6	6	1
14q32.33	106246288	106761968	515	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226	16	1
14q32.33	106329183	106849677	520	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226	10	1
14q32.33	106329183	106876355	547	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226	1	1
14q32.33	106329183	106896439	567	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226	22	1
14q32.33	106207204	106931309	724	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226	3	1
14q32.33	106329183	107179594	850	Duplicação	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226, NCRNA00221	19	1
16p11.2	32554241	33754119	1200	Duplicação	TP53TG3B, TP53TG3, SLC6A10P, LOC390705	9	1
17q21.31	44212823	44784639	571	Duplicação	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	5 , 12	2
17q21.31	44190670	44784639	593	Duplicação	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	14	1
17q21.31	44188450	44784639	596	Duplicação	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	17	1
17q21.31	44187491	44784639	597	Duplicação	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	6 , 7	2

DISTRIBUIÇÃO DE CNVs NOS CROMOSSOMOS

As 406 CNVs identificadas na análise geral distribuíram-se por todos os cromossomos, exceto no Y (Figura 7). Em contrapartida, o cromossomo X foi o que concentrou o maior número de CNVs, totalizando 87. Os cromossomos 18 e 21 apresentaram apenas 1 CNV, ambas detectadas no paciente 22.

Figura 7. Distribuição das CNVs encontradas por cromossomo.

PADRÃO DE RECORRÊNCIA DAS CNVs

Considerando a amostra total, 152 CNVs foram detectadas em apenas um indivíduo. Essas CNVs de ocorrência única estão distribuídas por todos os cromossomos, exceto no Y (Tabela 7).

Por meio da análise de sobreposição das CNVs detectadas, foram encontradas 252 CNVs compartilhadas entre dois ou mais indivíduos. Tais CNVs foram distribuídas em 59 CNVRs (Tabela 8).

Tabela 7. Recorrência das CNVs por cromossomo.

Cromossomo	Total de CNVs	CNVs únicas	CNVRs
1	22	10	3
2	12	6	2
3	27	9	5
4	11	5	2
5	17	7	2
6	29	11	3
7	20	9	4
8	28	9	1
9	9	9	0
10	6	2	1
11	29	4	6
12	19	4	4
13	8	4	1
14	32	5	2
15	7	5	1
16	6	3	1
17	13	1	3
18	1	1	0
19	12	3	3
20	4	2	1
21	1	1	0
22	6	6	0
X	87	36	14
Y	0	0	0
Total	406	152	59

Tabela 8. CNVRs encontradas nos pacientes com LES.

Localização genômica	Início	Fim	Tamanho (Kb)	CNVs incluídas nas CNVRs	Genes envolvidos	Pacientes	Número de pacientes
1q21.3	152761910	152773905	12,0	2 del	LCE1D	3, 21	2
1q32.2	210604732	210612839	8,1	3 del	HHAT	15, 18	3
1q44	248688586	248795277	106,7	8 del	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11	1, 2, 7, 11, 12, 19, 20, 23	8
2q33.1	203293011	203313469	20,5	2 del	BMP2	10, 19	2
2q34	213163737	213192832	29,1	4 del	ERBB4	5, 8, 16, 21	4
3p21.31	46780900	46872554	91,7	7 del	PRSS45, PRSS42	3, 5, 6, 8, 11, 18, 22	7
3p21.1	53031722	53038931	7,2	2 del	SFMBT1	1, 23	2
3p11.1	89387087	89419367	32,3	3 del	EPHA3	9, 17, 20	3
3q21.2	125708696	125721849	13,2	2 del	-	22, 23	2
3q28	189360266	189371964	11,7	4 del	TP63	3, 12, 14, 23	4
4q13.2	69435888	69551731	115,8	4 del	UGT2B15	5, 15, 22, 19	4
4q24	104199891	104251349	51,5	2 del	-	18, 22	2
5p11 - 5p12	45915731	46377314	461,6	2 del	-	5, 13	2
5q35.3	180378753	180430789	52,0	8 del	BTNL3	2, 9, 13, 14, 15, 21, 22, 23	8
6p25.3	254253	381137	126,9	7 del/2 dup	DUSP22	2, 6, 9, 11, 13, 14, 17, 19, 20	9
6q12	67004972	67051189	46,2	4 del	-	6, 17, 18, 19	4
6q14.1	78866468	79051614	185,1	4 del/1 dup	-	3, 4, 5, 10, 11	5
7p22.3	154720	158615	3,9	5 del	-	6, 10, 12, 15, 22	5
7p14.1	38319295	38349129	29,8	2 del	-	14, 19	2
7q22.1	100968362	101141867	173,5	2 dup	EMID2	12, 13	2
7q34	142453878	142485841	32,0	2 del	PRSS1, TRY6, PRSS2	14, 19	2
8p11.22	39225874	39389003	163,1	19 del	ADAM5P, ADAM3A	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22	19

10q26.3	135228992	135427143	198,2	4 dup	MTG1, SPRN, LOC619207, CYP2E1, SYCE1, SPRNP1	1, 10, 11, 22	4
11p15.4	5783909	5812365	28,5	8 del	OR52N5, OR52N1	1, 5, 6, 10, 11, 14, 16, 20	8
11p15.1	18941196	18971367	30,2	1 del/2 dup	MRGPRX1	1, 9, 17	5
11p11.2	48658169	48892181	234,0	2 del	-	5, 13	2
11p11.12	50344786	51267021	922,2	2 del	LOC646813	5, 7	2
11q11	54701631	55039246	337,6	2 del	TRIM48	13, 23	2
11q11	55374018	55452996	79,0	8 del	OR4P4, OR4S2, OR4C6	3, 5, 6, 11, 12, 15, 19, 22	8
12p13.2	11216816	11256728	39,9	4 del	PRR4, PRH1, TAS2R43	8, 18, 20, 23	4
12p11.23	27646150	27659531	13,4	3 del	C12orf70	1, 2, 15	3
12p11.21	31265043	31407111	142,1	2 dup	-	10, 12	2
12q23.1	99791638	99798721	7,1	6 del	ANKS1B	4, 5, 13, 19, 20, 23	6
13q21.1	57750940	57778367	27,4	4 del	-	3, 8, 16, 19	4
14q11.2	22578241	22944507	366,3	4 del	-	3, 14, 19	3
14q32.33	106207204	107184184	977,0	23 dup	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226, NCRNA00221	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23	20
15q11.2	24363482	24485873	122,4	2 del	PWRN2	6, 20	2
16q12.2	55796375	55821956	25,6	3 del	CES1P1	7, 14, 21	3
17q12	36283806	36410559	126,8	4 del	TBC1D3F, TBC1D3	3, 5	4
17q21.2	39511103	39526296	15,2	2 del	KRT33B	7, 18	2
17q21.31	44187491	44784639	597,1	8 dup	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	1, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 17	8
19p13.12	15777995	15833442	55,4	2 dup	CYP4F12	2, 10	2
19p12	20588836	20830021	241,2	2 del	ZNF826P, ZNF737, ZNF626	11, 13	2
19q13.2	41352625	41392187	39,6	5 del	CYP2A6, CYP2A7	1, 7, 12, 19, 23	5
20q13.2	52652344	52658506	6,2	2 del	BCAS1	7, 21	2
Xp22.33	354464	401509	47,0	3 dup	-	6, 13, 16	3

Xp22.33	784132	837452	53,3	2 del	-	3, 16	2
Xp22.33	1378501	1818776	440,3	2 del/4 dup	CSF2RA, IL3RA, SLC25A6	1, 3, 5, 11, 15, 16	6
Xp22.33	2295258	2302145	6,9	2 del	DHRX	16, 19	2
Xp22.31	6621971	6634382	12,4	2 dup	-	16, 23	2
Xp21.3	29111923	29117749	5,8	2 del	IL1RAPL1	16, 23	2
Xp11.22	53475174	53488727	13,6	2 del	-	1, 16	2
Xq23	115133388	115589080	455,7	5 del	SLC6A14	7, 10, 16, 20, 22	5
Xq26.1	129375241	129383116	7,9	4 del	ZNF280C	8, 13, 14, 23	4
Xq26.3	133642080	134947464	1305,4	3 del/1 dup	DDX26B, CT45A1, CT45A2, CT45A4, CT45A3, CT45A5	12, 16, 19	3
Xq26.3	134928992	134966528	37,5	1 del/5 dup	CT45A4, CT45A5, CT45A6	10, 11, 17, 20, 21, 23	6
Xq27.1	139493361	139806255	312,9	5 del/1 dup	-	2, 3, 5, 11, 15, 16	6
Xq28	147317018	147325589	8,6	5 del	-	8, 12, 19, 21, 22	5
Xq28	154918771	154952242	33,5	2 del	-	16, 23	2

DISTRIBUIÇÃO GERAL DAS CNVs ENVOLVENDO GENES

Do total de 406 CNVs detectadas no conjunto amostral, 269 CNVs (66,3%) ocorreram em regiões contendo genes ou parte deles (Figura 8). Dessas, 47 CNVs possuíam genes descritos no OMIM. Em relação às variantes contendo micro RNAs (miRNA) ou pequenos RNAs nucleares (snoRNAs), foram encontradas 4 CNVs (1,5%) (Tabela 9).

Figura 8. Distribuição do total de CNVs comparado àquelas que possuem genes nos pacientes com LES.

Tabela 9. Distribuição geral das CNVs que possuem genes nos pacientes com LES.

Paciente	Total de CNVs	CNVs com Genes	OMIM	sno/miRNA
1	17	13	1	1
2	10	8	0	0
3	18	9	4	0
4	5	3	0	0
5	51	32	13	0
6	12	8	0	0
7	15	11	1	1
8	14	9	1	0
9	11	8	0	0
10	17	12	4	0
11	20	15	2	0
12	14	9	2	0
13	17	10	1	0
14	16	13	1	0
15	14	10	2	0
16	31	15	3	1
17	13	9	0	0
18	15	9	1	0
19	23	14	4	0
20	13	10	1	0
21	21	15	1	1
22	17	10	2	0
23	22	17	3	0
Total	406	269	47	4

miRNA: micro RNA; snoRNA: pequenos RNAs nucleares.

CNVs COM GENES DESCRITOS NO OMIM

A relação das *CNVs* encontradas na amostra de pacientes com LES e as condições patogênicas foi estabelecida em parte, considerando os genes previamente descritos no OMIM. Foram encontradas 35 *CNVs* com genes descritos no OMIM em 18 indivíduos (Tabela 10).

Tabela 10. CNVs com genes descritos no OMIM.

Localização genômica	Tipo	Genes	DGV	Pacientes
1q21.3	deleção	FLG	sim	5
2p16.3	deleção	NRXN1	não	5
2q33.1	deleção	BMPR2	sim	10 e 19
3p12.2	deleção	GBE1	não	5
3p12.3	deleção	ROBO2	não	5
3q12.2	duplicação	GPR128, TFG	sim	3
3q28	deleção	TP63	sim	3, 12, 12 e 23
6p21.31	duplicação	FKBP5	sim	15
6q12	deleção	EYS	sim	3 e 5
6q25.1	deleção	ESR1	sim	10
7q31.1	deleção	FOXP2	não	5
7q34	deleção	PRSS1, TRY6, PRSS2	sim	19
7q35	deleção	CNTNAP2	não	10
8p22	deleção	TUSC3	sim	5
8q13.3	deleção	EYA1	sim	13
8q24.22	deleção	TG	sim	18
12p12.1	duplicação	LDHB, KCNJ8, ABCC9, CMAS, ST8SIA1	sim	11
12q21.33	deleção	KERA	não	5
13q31.3	deleção	GPC6	não	5
15q15.3	deleção	CKMT1B, STRC, CATSPER2	sim	5
16p13.3	duplicação	OR1F1, OR1F2P, ZNF200, MEFV, FLJ39639	sim	5
19q13.2	deleção	CYP2A6, CYP2A7	sim	1, 19 e 23
19q13.2	deleção	CYP2A6	sim	7 e 12
19q13.42	deleção	KIR3DP1, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4	sim	3
22q12.1	duplicação	CHEK2	sim	8
22q12.3	deleção	LARGE	sim	21
22q13.33	deleção	SHANK3	sim	11
Xp11.23	deleção	CLCN5	sim	16
Xp21.1	deleção	DMD	não	19
Xp21.3	deleção	IL1RAPL1	sim	16, 22 e 23
Xp22.2	deleção	MID1	não	10
Xp22.33	duplicação	CSF2RA, IL3RA, SLC25A6	sim	15
Xq23	deleção	SLC6A14	não	20 e 22
Xq26.3	duplicação	ZIC3	não	16
Xq28	deleção	OPN1LW	sim	5

CNVs NÃO DESCRITAS NO DGV

As CNVs foram avaliadas quanto à descrição em banco de dados de variantes estruturais do genoma. Com relação às CNVs não catalogadas no banco de dados DGV, isto é, não descritas em indivíduos controle, foram encontradas 39 em 14 pacientes (Tabela 11). A maioria apresentava genes, totalizando 27 CNVs (69,2%). Destes, 11 genes foram previamente descritos em condições patogênicas e catalogados no OMIM, e 10 foram descritos em banco de dados de regiões constitutivas do genoma, o ISCA. Das 39 CNVs não descritas no DGV, 36 (92,3%) ocorreram uma única vez e apenas 3 (7,7%) foram recorrentes.

Tabela 11. CNVs não descritas no DGV.

Localização genômica	Tipo	Tamanho (Kb)	Genes	OMIM	ISCA	Pacientes
1p31.3	deleção heterozigótica	12,8	-	não	sim	5
1q24.2	deleção heterozigótica	29,7	MPZL1	não	não	6
2p16.3	deleção heterozigótica	14,6	NRXN1	sim	sim	5
2p22.2	deleção heterozigótica	32,0	VIT	não	não	20
3p12.2	deleção heterozigótica	17,5	GBE1	sim	não	5
3p12.3	deleção heterozigótica	11,8	ROBO2	sim	não	5
3p14.1	duplicação heterozigótica	77,6	MAGI1	não	não	16
3q13.33	deleção heterozigótica	15,4	GTF2E1	não	não	21
4p12	deleção heterozigótica	21,3	GABRG1	não	não	16
4q35.1	duplicação heterozigótica	60,7	-	não	não	1
5p15.31	deleção heterozigótica	2,5	FLJ33360	não	não	8
5q33.2	deleção heterozigótica	44,2	-	não	não	5
6q12	deleção heterozigótica	18,0	EYS	sim	não	5
6q14.1	deleção heterozigótica	19,8	-	não	não	5
6q16.1	deleção heterozigótica	26,2	EPHA7	não	não	5
7p21.3	deleção heterozigótica	25,3	NXPH1	não	não	5
7q31.1	deleção heterozigótica	6,3	FOXP2	sim	sim	5
7q35	deleção heterozigótica	8,8	CNTNAP2	sim	sim	10
9q33.1	deleção heterozigótica	12,3	DBC1	não	não	5
11q14.1	deleção heterozigótica	24,1	DLG2	não	não	5
11q25	deleção heterozigótica	16,1	-	não	não	5
12q21.33	deleção heterozigótica	12,1	KERA	sim	não	5
13q31.3	deleção heterozigótica	8,1	GPC5	não	sim	5
13q31.3	deleção heterozigótica	8,9	GPC6	sim	sim	5
14q23.3	duplicação heterozigótica	37,4	GPHN	não	não	21
18q12.2	deleção heterozigótica	68,4	-	não	não	22
20p12.1	deleção homozigótica	23,2	MACROD2	não	não	17
Xp21.1	deleção heterozigótica	1,2	DMD	sim	sim	19
Xp22.2	deleção heterozigótica	2,1	MID1	sim	sim	10
Xq22.3	deleção heterozigótica	6,1	MID2	não	sim	14
Xq23	deleção heterozigótica	3,2	-	não	não	16
Xq24	deleção heterozigótica	11,0	-	não	não	19
Xq26.3	deleção heterozigótica	0,6	-	não	não	21
Xq26.3	duplicação heterozigótica	9,0	-	não	não	23
Xq26.3	duplicação homozigótica	29,2	ZIC3	sim	sim	16
Xq26.1	deleção heterozigótica	1,2	ZNF280C	não	não	8 e 13
Xq26.1	deleção heterozigótica	7,7	ZNF280C	não	não	14 e 23
Xq26.3	deleção heterozigótica	12	-	não	não	16 e 19
Xq27.1	deleção heterozigótica	1,8	-	não	não	8

CNVs NÃO DESCRITAS EM BANCO DE DADOS

A existência de CNVs catalogadas foi avaliada considerando os bancos de dados de variantes estruturais disponíveis online: *DECIPHER*, *ISCA* e *DGV*. Foram encontradas nove CNVs não descritas em bancos de dados em um total de cinco indivíduos (Tabela 12). O paciente cinco apresentou cinco das nove CNVs identificadas. A localização genômica e as características das CNVs não descritas podem ser observadas na Figura 9.

Tabela 12. CNVs não descritas em banco de dados.

Localização genômica	Tipo	Tamanho (Kb)	Genes	OMIM	Pacientes
4p12	deleção heterozigótica	21,3	GABRG1	não	16
4q35.1	duplicação heterozigótica	60,7	-	não	1
5q33.2	deleção heterozigótica	44,2	-	não	5
6q12	deleção heterozigótica	18,0	EYS	sim	5
9q33.1	deleção heterozigótica	12,3	DBC1	não	5
11q14.1	deleção heterozigótica	24,1	DLG2	não	5
11q25	deleção heterozigótica	16,1	-	não	5
18q12.2	deleção heterozigótica	68,4	-	não	22
14q23.3	duplicação heterozigótica	37,4	GPHN	não	21

Figura 9. Localização genômica das CNVs não descritas em banco de dados. Os triângulos vermelhos indicam segmentos deletados, enquanto que os azuis indicam os segmentos duplicados.

CNVs EM GENES RELACIONADOS COM AUTOIMUNIDADE

Com o auxílio da ferramenta *Cytoregions* do programa *ChAS* foi possível identificar regiões no genoma relacionadas com autoimunidade. Das 406 CNVs identificadas no conjunto amostral, foram encontradas seis CNVs em genes previamente relacionados com LES e uma CNV associada a Diabetes *Mellitus* autoimune tipo 1 (DM1), totalizando sete CNVs (Figura 10). Destas, duas foram recorrentes e cinco foram encontradas uma única vez na amostra. (Tabela 13). Todos os genes encontrados nessas regiões foram pesquisados em bases de dados *Ensembl Genome Browser* e *NCBI*, para análise de sua função e padrão de expressão.

Tabela 13. CNVs em genes relacionados com autoimunidade.

Localização genômica	Tipo	Tamanho (Kb)	Genes de interesse	Relevância	Pacientes
1q31.3	Deleção	49,2	CFHR4	Gene associado a LES	7
1q31.3	Deleção	22,8	CFHR5	Gene associado a LES	12
2q32.2	Deleção	17,8	STAT4	Gene associado a LES	2
6p21.32	Deleção	11,9	HLA-DPB2	Gene associado a LES	1 e 5
8q11.21	Deleção	0,4	SNTG1	CNV associada a diabetes tipo 1	21
Xp22.33	Deleção	9,9	IL3RA	Gene associado a autoimunidade	11
Xq28	Duplicação	0,9	MECP2	Gene associado a LES	3, 16, 17, 18, 21, 23 e 25

Figura 10. Localização genômica das CNVs relacionadas com autoimunidade. Os triângulos vermelhos indicam segmentos deletados, enquanto que os azuis indicam os segmentos duplicados.

CNVs COMUNS EM GENES RELACIONADOS COM AUTOIMUNIDADE

De forma similar à identificação de CNVs relacionadas com autoimunidade, a ferramenta *Cytoregions* proporcionou a detecção de CNVs comuns, isto é, com frequência maior do que 5% previamente descritas em associação com doenças autoimunes (Tabela 14).

Os processos biológicos dos genes envolvidos com autoimunidade foram classificados em dez vias de acordo com a ferramenta disponível online *PANTHER Classification System* (MI et al., 2010), incluindo apoptose, comunicação celular e processos sistêmicos (Figura 11).

Tabela 14. CNVs comuns presentes no conjunto amostral.

Localização genômica	Tipo	Genes de interesse	OMIM	DGV	ISCA	Pacientes	Número de pacientes
4q13.2	deleção	UGT2B15	não	sim	não	5, 15, 19 e 22	4
8p11.22	deleção	ADAM3A	não	sim	não	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 e 22	19
17q21.31	duplicação	KIAA1267	não	sim	não	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14 e 17	10

Figura 11. Processos biológicos dos genes envolvidos com autoimunidade presentes nas CNVs encontradas nos pacientes com LES. *PANTHER Classification System* (MI et al., 2010).

DISCUSSÃO

CASUÍSTICA

Considerando as 23 amostras de pacientes portadores de LES estudadas, houve predominância de mulheres (18 mulheres e 5 homens). Mesmo a casuística sendo pequena, a prevalência de mulheres acometidas pelo LES está em concordância com os aspectos epidemiológicos da doença (MAIDHOF; HILAS, 2012).

Os critérios de inclusão (presença de nefrite lúpica, lesões cutâneas, algum tipo de infecção, manifestações neurológicas) aplicados favorecem a seleção de casos mais severos que, por isso, dão mais segurança aos estudos genéticos, pois diminuem a chance de casos não LES em nossa amostra. Todas as mulheres atenderam aos critérios e os homens, somente aos três primeiros, também de acordo com a observação clínica de que o sexo feminino é mais sensível, em incidência e severidade, a LES.

QUALIDADE DOS DADOS

Somente um *chip* foi descartado das análises, pois apresentou problema de fabricação, constatado na etapa final dos experimentos de *aGH* quando se percebeu que o lacre que assegura a permanência da solução dentro do *chip* não vedava completamente, comprometendo a leitura posterior. Três *chips* não atingiram, para um dos parâmetros de qualidade, os valores de limiar, mas esta diferença, diante dos resultados das análises posteriores, demonstrou-se insignificante. Além disso, os elevados índices de qualidade em todos os parâmetros das lâminas restantes conferem alto grau de confiabilidade dos resultados obtidos.

PROPORÇÃO VARIÁVEL DO GENOMA

As CNVs contribuem para a diversidade genética e fenotípica humana. No entanto, a distribuição dessas variantes na população geral permanece largamente inexplorada (ITSARA et al., 2009).

A elaboração por Redon et al. (2006) do primeiro mapa abrangente de CNVs, baseada na análise de 270 indivíduos do projeto *HapMap* (GIBBS et al., 2003), teve papel chave no campo da descoberta de CNVs. A pesquisa foi realizada utilizando a combinação de duas plataformas, *aCGH* (*Whole Genome Tile Path array*) e *SNP array* (*Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K*), que proporcionaram cobertura de aproximadamente 90% do genoma e a estimativa da proporção variável do genoma, definida como a soma média (aproximadamente 340 Mb) do número de bases perdidas por deleção ou acrescentadas por duplicação, em 12% do genoma.

Ao combinar informações de sondas de SNPs e CNVs em uma versão mais recente do *SNP array* (*Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0*), McCarroll et al. (2008) desenvolveram um mapa de CNVs em que os limites das CNVs foram melhor estabelecidos. Este estudo forneceu um novo ponto de referência ao constatar que a maioria das CNVs descritas anteriormente nos 270 indivíduos do projeto *HapMap* eram de cinco a 15 vezes menores do que inicialmente relatadas por meio de abordagens com resolução inferior (MCCARROLL, 2008; REDON et al., 2006).

Conforme esperado, plataformas de microarranjo de alta densidade recentemente desenvolvidas apresentam maior resolução em detectar pequenas variantes. Entre elas, a tecnologia CytoScan HD™, aplicada ao presente trabalho, é capaz de detectar cerca de 2,6 milhões de CNVs e 750 mil SNPs, proporcionando resultados mais confiáveis com alta resolução.

Esta metodologia permitiu observar distribuição unimodal da contagem de CNVs, com média de 18 variantes por indivíduo (Tabela 4), e soma média dos segmentos deletados/duplicados igual a 1796 kb, que corresponde a uma proporção variável de 0,06% do genoma (Tabela 15). Esses achados se aproximam do que foi relatado por Vogler et al. (2010) em que a média foi de 7

CNVs por indivíduo e soma média da variação de 540 kb, aproximadamente 0,02% do genoma, mas contrastam com os valores relatados por Redon et al., (2006) e McCarroll et al. (2008). Embora não exista um consenso sobre a proporção variável do genoma, pode-se observar que existe uma tendência de diminuição das estimativas dessa porcentagem, paralela ao desenvolvimento de plataformas com maior resolução e capacidade de detecção de CNVs.

Tabela 15. Proporção variável do genoma representada pelas CNVs nos pacientes com LES.

Paciente	Genoma duplicado		Genoma Deletado		Porção variável do genoma total	
1	969 kb	0,03%	350 kb	0,01%	1319 kb	0,04%
2	441 kb	0,01%	608 kb	0,02%	1049 kb	0,03%
3	852 kb	0,03%	861 kb	0,03%	1714 kb	0,06%
4	433 kb	0,01%	219 kb	0,01%	652 kb	0,02%
5	1364 kb	0,05%	3670 kb	0,12%	5034 kb	0,17%
6	1695 kb	0,06%	644 kb	0,02%	2339 kb	0,08%
7	1694 kb	0,06%	1096 kb	0,04%	2790 kb	0,09%
8	509 kb	0,02%	265 kb	0,01%	775 kb	0,03%
9	1774 kb	0,06%	536 kb	0,02%	2311 kb	0,08%
10	1083 kb	0,04%	440 kb	0,01%	1523 kb	0,05%
11	1495 kb	0,05%	625 kb	0,02%	2121 kb	0,07%
12	864 kb	0,03%	477 kb	0,02%	1341 kb	0,04%
13	980 kb	0,03%	1394 kb	0,05%	2374 kb	0,08%
14	1465 kb	0,05%	876 kb	0,03%	2342 kb	0,08%
15	575 kb	0,02%	563 kb	0,02%	1138 kb	0,04%
16	809 kb	0,03%	927 kb	0,03%	1736 kb	0,06%
17	1291 kb	0,04%	394 kb	0,01%	1685 kb	0,06%
18	418 kb	0,01%	792 kb	0,03%	1209 kb	0,04%
19	1122 kb	0,04%	1142 kb	0,04%	2264 kb	0,08%
20	75 kb	0,00%	451 kb	0,02%	526 kb	0,02%
21	1164 kb	0,04%	639 kb	0,02%	1803 kb	0,06%
22	1041 kb	0,03%	708 kb	0,02%	1749 kb	0,06%
23	1073 kb	0,04%	434 kb	0,01%	1506 kb	0,05%
Soma média	1008 kb	0,03%	787 kb	0,03%	1796 kb	0,06%

PERFIL DE CNVS NO GENOMA

Para que a análise padrão dos resultados encontrados minimizasse a detecção de falso-positivos, o número mínimo de marcadores para a identificação de CNVs foi maior para duplicações do que para deleções, 50 e 25, respectivamente. A exigência de um número maior de marcadores para a detecção de duplicações apresenta um viés que é neutralizado quando se considera o fato de que as duplicações de forma geral envolvem segmentos genômicos maiores do que as deleções e, portanto, cobrem regiões que possuem usualmente mais marcadores do que o limite aqui determinado (CHOY et al., 2010).

Do total de 406 CNVs detectadas, 311 corresponderam a deleções (77%) e 95 a duplicações (23%). Como esperado, foram encontradas menos CNVs em homozigose do que em heterozigose, 31 e 375, respectivamente (Tabela 4) estando de acordo com outros trabalhos (SHARP et al., 2005; TUZUN et al., 2005).

A distribuição de tamanho das CNVs mostrou que as faixas de tamanho mais comuns, observadas nos pacientes com LES, foram de CNVs entre 10 e 100 kb e entre 100 e 450 kb, respectivamente (Tabela 5). Esses dados contrastam com as estimativas do DGV (Database of Genomic Variants, 2013) nas quais a faixa de tamanho mais comum das variantes catalogadas no banco de dados é a de CNVs menores, entre 1 e 10 kb.

Na literatura, estima-se que 65 a 80% dos indivíduos tem pelo menos uma CNV com menos de 100 kb de tamanho, 5 a 10% apresentam uma CNV com mais de 450 kb e que apenas 1% possuem CNVs maiores do que 1 Mb (ITSARA et al., 2009; VOGLER et al., 2010). Em contrapartida, os resultados obtidos pela distribuição de CNVs na nossa amostra demonstraram números mais elevados em relação às CNVs menores do que 100 kb e maiores do que 450 kb, visto que todos os pacientes apresentaram CNVs menores do que 100 kb, e a maioria deles (16 pacientes) apresentou uma CNV maior do que 450 kb (Tabela 6). Parte dessas CNVs foi encontrada em mais de um paciente, caracterizando-se como comuns na amostragem aqui estudada.

Embora o tamanho de uma CNV por si só não possa ser usado como preditor de patogenicidade (ITSARA et al., 2009), as diferenças encontradas no tamanho das CNVs nos pacientes com LES em relação à literatura e ao principal banco de dados de variantes estruturais, o DGV, sugere que grandes CNVs podem estar envolvidas na etiologia do LES.

RECORRÊNCIA DE CNVS

Do total de 406 CNVs detectadas, 152 foram de ocorrência única (37,5%) e 254 foram recorrentes entre os pacientes analisados (62,5%) (Tabela 7). Este relato está de acordo com o que foi encontrado por Shaikh et al. (2009) em que a maioria das CNVs detectadas em amostra de indivíduos controle foi classificada como não-única, recorrentes em mais de um indivíduo não relacionado.

Embora tenham sido encontradas CNVs idênticas umas às outras, compartilhadas entre dois ou mais pacientes, em geral, a sobreposição das CNVs recorrentes não é total. A maioria das CNVs recorrentes apresenta pontos de quebra distintos, ou seja, apresenta o mesmo início, mas varia no término, e vice-versa, ou ainda, não compartilham posições iniciais e finais, porém se sobrepõem em mais de 90% da sequência. Dessa forma, as CNVs recorrentes são comumente categorizadas em CNVRs, que representam a região de CNVs que se sobrepõe entre os indivíduos. No presente estudo, foram descritas 59 CNVRs, que englobaram as 254 CNVs recorrentes (Tabela 7).

O fato da existência de CNVs idênticas ser incomum pode ser reflexo da formação de CNVs ocorrer com alta taxa de mutação. Estima-se que a taxa de mutação *locus*-específica de CNVs é de $1,7 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ por *locus* (LUPSKI, 2007; VAN OMMEN, 2005), enquanto que a taxa de mutação de SNPs por geração é $1,8-2,5 \times 10^{-8}$ por par de base por geração (KONDRASHOV, 2002; NACHMAN; CROWELL, 2000). Isto revela uma magnitude de geração de CNVs de 100 a 10 mil vezes maior do que a taxa de substituição de nucleotídeos. Além disso, diferente da taxa de mutação de

SNPs que é relativamente constante, as taxas de mutação de *CNVs* podem variar amplamente em diferentes *loci*, o que provavelmente reflete diferenças nos mecanismos de formação das *CNVs* e na arquitetura genômica local ou regional susceptível à instabilidade genômica (ZHANG et al., 2009).

RELEVÂNCIA FUNCIONAL DAS *CNVs* IDENTIFICADAS

A análise genética de LES durante várias décadas, incluindo uma série de recentes estudos de associação genômica em larga escala, revelou mais de 30 *loci* de suscetibilidade à doença (MUELLER et al., 2013).

As pesquisas realizadas com *CNVs* e LES até o presente momento englobaram a análise pontual das variantes (MORRIS et al., 2010; WU et al., 2008) em que foram relatadas principalmente *CNVs* nos genes *FCGR3B* (MCKINNEY et al., 2010) e *C4* (YANG, Y. et al., 2007), cujo baixo número de cópias foi associado com aumento da susceptibilidade a LES. No presente trabalho, não foram encontradas *CNVs* em tais genes. Entretanto, descrevemos, pela primeira vez, *CNVs* em outros cinco genes previamente associados com LES: *CFHR4*, *CFHR5*, *STAT4*, *MECP2* e *HLA-DPB2* (Figura 10, Tabela 13).

O LES é uma doença autoimune poligênica que está associada com aumento da ativação do complemento. As variantes de genes que codificam o fator H regulador do complemento (*CFH*) e cinco proteínas relacionadas com *CFH* (*CFHR1-CFHR5*) dentro do *locus* 1q32, podem contribuir para a desregulação da ativação do complemento, predispondo ao desenvolvimento de LES (ZHAO, J. et al., 2011).

No nosso estudo, encontramos duas deleções únicas em dois pacientes, uma de 49 kb e outra de 23 kb nos genes *CFHR4* e *CFHR5*, respectivamente. Funcionalmente, o gene *CFHR4* tem papel-chave na regulação do complemento. A proteína *CFHR4* se liga a uma forma pentamérica da proteína C-reativa (pCRP) e recruta pCRP para a superfície das células necróticas,

aumentando a remoção das mesmas ou facilitando a ligação e ativação do complemento C1q (MIHLAN et al., 2009). Além disso, tem sido proposto que *CFHR4* limita a inflamação, aumentando a atividade do cofator do *CFH* e a deposição de complemento pela ligação a pCRP, que auxilia na fagocitose de micro-organismos e de células necróticas em tecidos inflamados (HEBECKER et al., 2011). Se *CFHR4* regula a ativação do complemento e a opsonização em superfícies biológicas por meio de interação com pCRP (CANTSILIERIS et al., 2012), a potencial deleção desse gene levaria a redução na ligação à pCRP e assim limitaria a sua capacidade de inibir a inflamação, conduzindo ao avanço do LES. Uma vez que cada gene *CFH-CFHRs* representa um componente funcional diferente para a regulação do complemento, sugere-se que o equilíbrio homeostático entre *CFH*, *CFHR3*, *CFHR1* e *CFHR4* é necessário para manter a regulação da ativação do complemento (ZHAO, J. et al., 2011).

As células do sistema imune de pacientes com LES apresentam anormalidades, incluindo a redução na citotoxicidade de células T, ativação irregular de células B e alterações na biossíntese de citocinas (ABELSON et al., 2009; NIEWOLD et al., 2007). Nesse contexto, o gene *STAT4* (transdutores de sinal e ativador da transcrição) é expresso em células T e B, monócitos, macrófagos, células *natural killer* (NK), células dendríticas e codifica um fator de transcrição que medeia o efeito de várias citocinas, como *IL-12*, *IL-23* e *interferon* (INF) tipo I (JACOB, C. O. et al., 2009). Por conseguinte, alterações no *STAT4* podem afetar a produção de autoanticorpos e a regulação da apoptose (CROW; KIROU, 2004).

GWAS tem demonstrado a contribuição de SNPs no *STAT4* G>C (*rs7582694*) e G>T (*rs7574865*) em que os alelos C e T foram associados, respectivamente, com maior incidência de LES em vários grupos étnicos e com severidade de comprometimento renal (nefrite), uma das manifestações clínicas mais comuns da doença (HELLQUIST et al., 2010; MARTINEZ et al., 2008). No presente trabalho, identificamos uma deleção de 17,8 kb no *STAT4*, detectada pela primeira vez em pacientes com LES, que fornece indícios de que CNVs nesse gene contribuem para a patogênese de LES. Além disso,

considerando que *SNPs* no *STAT4* foram associados com outras doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, doença de Crohn, asma e esclerose sistêmica (LI et al., 2011), *CNVs* no *STAT4* podem estar relacionadas com autoimunidade de forma geral.

Além disso, foi encontrada uma deleção no gene *IL3RA*, receptor da *IL3*. Esta interleucina e seu respectivo receptor são responsáveis pela ativação da via de sinalização *JAK/STAT* ([KEGG:hsa04630](#)) envolvida com autoimunidade, a qual o *STAT4* tem participação (LUO et al., 2012). Deleções no gene *IL3RA* podem exercer função na geração de fenótipos autoimunes, embora os mecanismos moleculares ainda não tenham sido amplamente estudados.

A maior prevalência de LES em mulheres sugere que genes do cromossomo X poderiam contribuir na etiologia da doença (GUERRA et al., 2012). Pacientes do sexo masculino com síndrome de *Klinefelter* (47, XXY) apresentam risco semelhante para desenvolver LES em comparação com as mulheres (SAWALHA et al., 2008). A presença de genes de susceptibilidade ao LES no cromossomo X e a superexpressão de genes como resultado da perda da inativação aleatória do X são possíveis explicações que sugerem a existência de efeito de dosagem gênica. A inativação do X é mediada por metilação do DNA (QIN et al., 2012). Entretanto, pacientes com LES apresentam defeitos na metilação do DNA nas células T (SAWALHA; RICHARDSON, 2005), o que torna ambas as cópias dos dois cromossomos X, em pacientes do sexo feminino e do sexo masculino com síndrome de *Klinefelter* e LES, disponíveis para a transcrição. Este mecanismo é sugerido para explicar a superexpressão de alguns genes do cromossomo X (LU et al., 2007).

Nesse sentido, a distribuição de *CNVs* nos cromossomos observada na nossa amostra mostrou que a maioria das *CNVs* detectadas concentra-se no cromossomo X. Dentre elas, grande parte consiste em duplicações nos pacientes do sexo feminino. Dessa forma, podemos inferir que além da deficiência do padrão de metilação, a superexpressão de alguns genes do cromossomo X pode ser decorrente do aumento do número de cópias dos genes.

Adicionalmente, os nossos resultados fornecem destaque para a duplicação encontrada no gene *MECP2* (*Methyl-CpG-binding protein 2*), localizado no cromossomo Xq28, em 7 pacientes com LES (seis mulheres e um homem). *MECP2* (OMIM#300005) desempenha papel em dois mecanismos epigenéticos, metilação do DNA e desacetilação de histonas, que resulta no silenciamento da expressão por tornar a configuração da cromatina inacessível para a transcrição gênica (SAWALHA et al., 2008). Baseado na evidência de que defeitos na metilação do DNA tem sido implicados na patogênese do LES em modelos murinos e humanos (KAISER; CRISWELL, 2010; PATEL; RICHARDSON, 2010), Sawalha et al. (2008) genotiparam 21 *SNPs* localizados dentro ou entre as regiões flangeadoras de *MECP2* e constataram forte associação entre o gene e a susceptibilidade a LES em duas populações etnicamente distintas. As interações genéticas e epigenéticas na patogênese da doença podem proporcionar uma ideia mais clara sobre predominância de LES em mulheres e sugerir um novo mecanismo para explicar a superexpressão de genes sensíveis à metilação observados em células T, como o *MECP2*, que resulta na produção de células T autorreativas nos pacientes com LES.

No presente estudo, mostramos pela primeira vez *CNVs* no pseudogene *HLA-DPB2* em pacientes com LES. O MHC no cromossomo 6 contém cerca de 100 genes diferentes que afetam o sistema imune, incluindo aqueles com forte associação com a susceptibilidade ao LES, como os alelos do MHC de classe II *HLA-DRB1*0301* e *HLA-DRB1*1501* (FERNANDO et al., 2007). Os alelos *HLA-DPB1* e *HLA-DPB2* apresentam desequilíbrio de ligação relativamente baixo com outros haplótipos de MHC (ZHOU, 2009). Embora não tenham sido amplamente estudados como o *HLA-A,-B,-C*, e *-DR*, exercem função semelhante de apresentação de antígeno para ativar células T CD4⁺ (SABETI et al., 2002) e os polimorfismos nesses genes foram associados com artrite reumatoide (MCHUGH et al., 2006), DM1 (SANCHEZ et al., 2006) e asma (ZHAO, Y. et al., 2009). A deleção de 11,9 kb no *HLA-DPB2* encontrada em dois pacientes do conjunto amostral pode contribuir para a patogênese da doença.

No contexto da autoimunidade de forma geral, Grayson et al. (2010) detectaram cinco CNVs envolvidas com diabetes autoimune do tipo 1 (DM1) na formação de autoanticorpos, dentre elas a deleção no gene *SNTG1*, que foi a mais frequente nos casos de DM1. O gene *SNTG1* está localizado no *locus* 8q11.12 e codifica gama sintrofina, uma membrana citoplasmática periférica expressa no cérebro (BASHIARDES et al., 2004). Embora o gene não esteja envolvido diretamente com autoimunidade, sugere-se que a deleção de sequências evolutivamente conservadas pode levar a desregulação na dosagem de outros genes que se encontram próximos à região variável do cromossomo 8 (GRAYSON et al., 2010). No presente estudo, encontramos uma deleção de 0,9 kb no gene *SNTG1*. Genes sensíveis à dosagem, como o *SNTG1* podem contribuir na susceptibilidade a doenças autoimunes de forma geral (LLEO et al., 2010).

Em relação às CNVs comuns identificadas no presente estudo, encontramos CNVs recorrentes nos genes *KIA1267*, *ADAM3A* e *UTG2B15* relacionados com LES ou com autoimunidade (Tabela 14) (LI et al., 2011). Os nossos achados corroboram com os de Bronstad et al. (2011), no qual identificaram CNVs frequentes nos mesmos genes (*KIA1267* e *ADAM3A*) ou família de genes (*UTG2B28*), em pacientes com doença autoimune de Addison (AD). Após validação destes dados em número maior de pacientes com AD e controles, a duplicação em *ADAM3A* e a deleção em *UTG2B28* foram associadas com a susceptibilidade à AD (BRONSTAD, I. et al., 2011). O mecanismo pelo qual esta susceptibilidade é conferida é pouco claro, mas pode envolver inativação de esteroide (*UGT2B28*) e maturação de células T (*ADAM3A*). Esses achados sugerem que CNVs comuns em genes imunoregulatórios podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este foi o primeiro estudo que desenvolveu triagem de *CNVs* em larga escala em pacientes com LES.

A metodologia aplicada no presente trabalho mostrou-se eficiente na geração de dados confiáveis e de alta densidade.

A proporção variável do genoma representada pelas *CNVs* em nosso trabalho foi menor do que a relatada inicialmente na literatura, mas concordou com outros trabalhos recentemente desenvolvidos e metodologicamente semelhantes.

A distribuição de *CNVs* nos cromossomos revelou maior prevalência de *CNVs* no cromossomo X, o que está de acordo com dados de outros trabalhos que apontam relação entre genes do X e autoimunidade e com os traços epidemiológicos da doença.

O perfil de *CNVs* apresentou prevalência de *CNVs* recorrentes, categorizadas em *CNVRs* distribuídas ao longo do genoma.

Embora o tamanho de uma *CNV* por si só não possa ser usado como preditor de patogenicidade, as diferenças encontradas no tamanho das *CNVs* nos pacientes com LES em relação à literatura e ao principal banco de dados de variantes estruturais, o *DGV*, sugere que grandes *CNVs* podem estar envolvidas na etiologia do LES.

A análise comparativa das *CNVs* encontradas na amostra de LES com banco de dados de variantes estruturais (*DGV*, *DECIPHER* e *ISCA*) possibilitou a descrição de nove *CNVs* não catalogadas anteriormente nestas bases de dados.

Identificamos *CNVs* em cinco genes previamente relacionados com LES, ainda não descritas na literatura em associação com a doença, que podem contribuir para a susceptibilidade a LES e/ou a doenças autoimunes.

As nossas perspectivas consistem em dar seguimento ao estudo iniciado, analisando os controles, já coletados, em comparação com o grupo de pacientes com seu número aumentado para um tamanho adequado a estudos de associação e que permitam conclusões que certamente transcenderão a aplicação restrita ao LES, pois terão reflexos mais amplos sobre a compreensão das bases genéticas dos fenótipos autoimunes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access**. Saunders, 2010.

ABELSON, A. K. et al. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 11, p. 1746-1753, 2009.

AHMAD, Y. A.; BRUCE, I. N. Genetic epidemiology: systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res**, v. 3, n. 6, p. 331-6, 2001.

AITMAN, T. J. et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 851-855, 2006.

ALARCON-SEGOVIA, D. et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1138-1147, 2005.

ALKAN, C.; COE, B. P.; EICHLER, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 5, p. 363-76, 2011.

AMUR, S.; PAREKH, A.; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. **Journal of autoimmunity**, 2012.

ARDOIN, S. P.; PISETSKY, D. S. Developments in the scientific understanding of lupus. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 5, p. 218, 2008.

BASHIARDES, S. et al. SNTG1, the gene encoding γ -syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis. **Human genetics**, v. 115, n. 1, p. 81-89, 2004.

BLAUW, H. M. et al. Copy-number variation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide screen. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 4, p. 319-26, 2008.

BOCHUKOVA, E. G. et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. **Nature**, v. 463, n. 7281, p. 666-70, 2010.

BORBA, E. F. et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 4, p. 196-207, 2008.

BOUTS, Y. M. et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. **Autoimmunity**, n. 0, p. 1-1, 2012.

BRONSTAD, I. et al. Genome-wide copy number variation (CNV) in patients with autoimmune Addison's disease. **BMC medical genetics**, v. 12, n. 1, p. 111, 2011.

CANTSILIERIS, S. et al. Comprehensive Analysis of Copy Number Variation of Genes at Chromosome 1 and 10 Loci Associated with Late Age Related Macular Degeneration. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35255, 2012.

CASCIOLA-ROSEN, L. A.; ANHALT, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **J Exp Med**, v. 179, p. 1317-1330, 1994.

CERVINO, A. C.; TSINOREMAS, N. F.; HOFFMAN, R. W. A Genome Wide Study of Lupus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, n. 1, p. 131-139, 2007.

CHOY, K. W. et al. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. **BJOG**, v. 117, n. 4, p. 391-8, 2010.

CLEMENS, L. E.; SIITERI, P. K.; STITES, D. P. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 122, n. 5, p. 1978-1985, 1979.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Advances in immunology**, v. 54, p. 229-270, 1993.

COSTENBADER, K. H. et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 4, p. 1251-1262, 2007.

CROW, M. K.; KIROU, K. A. Interferon-[alpha] in systemic lupus erythematosus. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 5, p. 541-547, 2004.

DISKIN, S. J. et al. Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 987-991, 2009.

DORNER, T.; GIESECKE, C.; LIPSKY, P. E. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 5, p. 243, 2010.

EDBERG, J. C. et al. Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 8, p. 2132-2140, 2002.

FANCIULLI, M. et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. **Nature genetics**, v. 39, n. 6, p. 721-723, 2007.

FERNANDO, M. M. et al. Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. **PLoS genetics**, v. 3, n. 11, p. e192, 2007.

GIBBS, R. A. et al. The international HapMap project. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 789-796, 2003.

GLEICHER, N.; BARAD, D. H. Gender as risk factor for autoimmune diseases. **Journal of autoimmunity**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2007.

GONZALEZ, E. et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. **Science Signalling**, v. 307, n. 5714, p. 1434, 2005.

GRAYSON, B. L. et al. Genome-wide analysis of copy number variation in type 1 diabetes. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e15393, 2010..

GUERRA, S. G.; VYSE, T. J.; GRAHAM, D. S. C. The genetics of lupus: a functional perspective. **enzyme**, v. 2, p. 3, 2012.

HARLEY, I. T. W. et al. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 5, p. 285-290, 2009.

HE, Y.; HOSKINS, J. M.; MCLEOD, H. L. Copy number variants in pharmacogenetic genes. **Trends in Molecular Medicine**, 2011.

HEBECKER, M. et al. Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4. **Molecular immunology**, v. 47, n. 6, p. 1347-1355, 2011.

HELLQUIST, A. et al. Variation in STAT4 is associated with systemic lupus erythematosus in a Finnish family cohort. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 5, p. 883-886, 2010.

HOCHBERG, M. C. The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 14, n. 5, p. 867-9, 1987.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725-1725, 1997.

HOLLOX, E. J. et al. Psoriasis is associated with increased β -defensin genomic copy number. **Nature genetics**, v. 40, n. 1, p. 23-25, 2007.

IAFRATE, A. J. et al. Detection of large-scale variation in the human genome. **Nature genetics**, v. 36, n. 9, p. 949-951, 2004.

IKEDA, M. et al. Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population. **Biological Psychiatry; Biological Psychiatry**, 2010.

INGELMAN-SUNDBERG, M. et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. **Pharmacology & therapeutics**, v. 116, n. 3, p. 496-526, 2007.

ISKOW, R. C.; GOKCUMEN, O.; LEE, C. Exploring the role of copy number variants in human adaptation. **Trends in Genetics**, 2012.

ITSARA, A. et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 2, p. 148-161, 2009.

JACOB, C. O. et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6256-6261, 2009.

JACOB, K. et al. Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. **British journal of cancer**, v. 101, n. 4, p. 722-733, 2009.

JAKOBSSON, M. et al. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 998-1003, 2008.

KAISER, R.; CRISWELL, L. A. Genetics research in systemic lupus erythematosus for clinicians: methodology, progress, and controversies. **Current opinion in rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 119, 2010.

KONDRASHOV, A. S. Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. **Human mutation**, v. 21, n. 1, p. 12-27, 2002.

LAU, C.; YIN, G.; MOK, M. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. **Lupus**, v. 15, n. 11, p. 715-719, 2006.

LEHMANN, P. et al. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 181-187, 1990.

LETTRE, G.; RIOUX, J. D. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. **Human molecular genetics**, v. 17, n. R2, p. R116-R121, 2008.

LI, P. et al. Association of genetic variations in the STAT4 and IRF7/KIAA1542 regions with systemic lupus erythematosus in a Northern Han Chinese population. **Human immunology**, v. 72, n. 3, p. 249, 2011.

LLEO, A. et al. Definition of human autoimmunity autoantibodies versus autoimmune disease. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A259-A266, 2010.

LU, Q. et al. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6352-6358, 2007.

LUO, X. et al. The Interleukin 3 Gene (IL3) Contributes to Human Brain Volume Variation by Regulating Proliferation and Survival of Neural Progenitors. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50375, 2012.

LUPSKI, J. R. Genomic rearrangements and sporadic disease. **Nature genetics**, v. 39, p. S43-S47, 2007.

MAIDHOF, W.; HILAS, O. Lupus: An Overview of the Disease And Management Options. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 4, p. 240, 2012.

MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747-753, 2009.

MARTINEZ, A. et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune mediated diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 9, p. 2598-2602, 2008.

MCCARROLL, S. A. Extending genome-wide association studies to copy-number variation. **Human molecular genetics**, v. 17, n. R2, p. R135-R142, 2008.

MCCARTHY, M. I. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 5, p. 356-369, 2008.

MCHUGH, N. J. et al. MHC class II, tumour necrosis factor $\hat{I}\pm$, and lymphotoxin $\hat{I}\pm$ gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 4, p. 488-494, 2006.

MCKINNEY, C. et al. Association of variation in Fc $\hat{I}^3$ receptor 3B gene copy number with rheumatoid arthritis in Caucasian samples. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 9, p. 1711-1716, 2010.

MI, H. et al. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl 1, p. D204-D210, 2010.

MIHLAN, M. et al. Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. **Molecular immunology**, v. 46, n. 3, p. 335-344, 2009.

MILLER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MORRIS, D. L. et al. Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 9, p. 1027-1031, 2010.

MOSER, K. L. et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14869-14874, 1998.

MUELLER, M. et al. Genomic Pathology of SLE-Associated Copy-Number Variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B Locus. **The American Journal of Human Genetics**, 2013.

MUNOZ, L. et al. SLE a disease of clearance deficiency? **Rheumatology**, v. 44, n. 9, p. 1101-1107, 2005.

MUSONE, S. L. et al. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. **Nature genetics**, v. 40, n. 9, p. 1062-1064, 2008.

NACHMAN, M. W.; CROWELL, S. L. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. **Genetics**, v. 156, n. 1, p. 297-304, 2000.

NIEWOLD, T. et al. High serum IFN- γ activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. **Genes and immunity**, v. 8, n. 6, p. 492-502, 2007.

PATEL, D. R.; RICHARDSON, B. C. Epigenetic mechanisms in lupus. **Current opinion in rheumatology**, v. 22, n. 5, p. 478-482, 2010.

PERRY, G. H. et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. **Nature genetics**, v. 39, n. 10, p. 1256-1260, 2007.

PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Seminars in arthritis and rheumatism, 2010. NIH Public Access. p.257.

PROKUNINA, L. et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature genetics**, v. 32, n. 4, p. 666-669, 2002.

PTACEK, T. et al. Copy number variants in genetic susceptibility and severity of systemic lupus erythematosus. **Cytogenetic and genome research**, v. 123, n. 1-4, p. 142-147, 2008.

QIN, H. H. et al. Associations between aberrant DNA methylation and transcript levels of DNMT1 and MBD2 in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Australasian Journal of Dermatology**, 2012.

RAVIRAJAN, C. T. et al. Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis. **European journal of immunology**, v. 28, n. 1, p. 339-350, 1998.

REDON, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, v. 444, n. 7118, p. 444-454, 2006.

SABETI, P. C. et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 832-837, 2002.

SANCHEZ, E. et al. Phenotypic associations of genetic susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 10, p. 1752-1757, 2011.

SANCHEZ, E. et al. No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 45, n. 9, p. 1096-1100, 2006.

SARZI-PUTTINI, P. et al. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. **Autoimmunity**, v. 38, n. 7, p. 465-472, 2005.

SATO, E. I. Lúpus eritematoso sistêmico. **Prado F C. Atualização Terapêutica**, p. 1382-7, 2001.

SATO, E. I. et al. Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista brasileira de reumatologia= Brazilian journal of rheumatology. Campinas. Vol. 48, n. 4 (jul./ago. 2008), p. 196-207, 2008..**

SAWALHA, A. H.; RICHARDSON, B. DNA methylation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Current Pharmacogenomics**, v. 3, n. 1, p. 73-78, 2005..

SAWALHA, A. H. et al. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. e1727, 2008.

SCOFIELD, R. H. et al. Klinefelter's syndrome (47, XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene dose effect from the X chromosome. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 8, p. 2511-2517, 2008.

SEBAT, J. Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. **Nat Genet**, v. 39, n. 7 Suppl, p. S3-5, 2007.

SEBAT, J. et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science**, v. 305, n. 5683, p. 525-8, 2004.

SHAIKH, T. H. et al. High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. **Genome research**, v. 19, n. 9, p. 1682-1690, 2009.

SHARP, A. J. et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. **American journal of human genetics**, v. 77, n. 1, p. 78, 2005.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annual review of medicine**, v. 61, p. 437-455, 2010.

STRANGER, B. E. et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 848-853, 2007.

TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271-1277, 1982.

TUZUN, E. et al. Fine-scale structural variation of the human genome. **Nature genetics**, v. 37, n. 7, p. 727-732, 2005.

VAN OMMEN, G. J. B. Frequency of new copy number variation in humans. **Nature genetics**, v. 37, n. 4, p. 333-334, 2005.

VOGLER, C. et al. Microarray-based maps of copy-number variant regions in European and sub-Saharan populations. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15246, 2010.

VRIJENHOEK, T. et al. Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 4, p. 504-510, 2008.

WAIN, L. V.; TOBIN, M. D., Eds. **Copy number variation**. Methods Mol Biol, v.713, p.167-83, Methods Mol Biol, 2010/12/15 ed. 2011.

WALTERS, R. et al. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11. 2. **Nature**, v. 463, n. 7281, p. 671-675, 2010.

WILLCOCKS, L. C.; SMITH, K.; CLATWORTHY, M. R. Low-affinity Fcγ receptors, autoimmunity and infection. **Expert Rev. Mol. Med**, v. 11, p. e24, 2009.

WU, Y. et al. Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus. **Cytogenetic and genome research**, v. 123, n. 1-4, p. 131-141, 2008.

YANG, M. L. et al. Lupus autoimmunity altered by cellular methylation metabolism. **Autoimmunity**, 2012.

YANG, Y. et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 6, p. 1037-1054, 2007.

YU, B. et al. Copy number variations of interleukina 17F, interleukina 21, and interleukina 22 are associated with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 11, p. 3487-3492, 2011.

ZHANG, F. et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 451-481, 2009.

ZHAO, J. et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002079, 2011.

ZHAO, Y. et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma. **International archives of allergy and immunology**, v. 151, n. 4, p. 297-307, 2009.

ZHOU, F. Molecular mechanisms of IFN-α to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. **International reviews of immunology**, v. 28, n. 3-4, p. 239-260, 2009.

Apêndice

Apêndice 1. Características clínicas dos pacientes selecionados.

Paciente	Sexo	Ano do Nascimento	Manifestações Clínicas			
			Infecções	Doenças	Neurológicas	Cutâneas
1	Masculino	1976	Serosite, herpes <i>zoster</i> , úlcera oral	Nefrite, Cushing iatrogênico, alterações hematológicas, obesidade, poliartrite, GNMP		<i>Tinea corporis</i>
2	Masculino	1985	Staphilococcemia, ITU, <i>stafilococcus aureus</i> , pneumonia hospitalar	Nefrite, artrite, HAS, leucopenia, insuficiência renal, obesidade, necrose tubular aguda, fibromialgia, fotossensibilidade, GNPD		<i>Rash malar</i> , lesões pele, criptocose cutânea, ptiíase versicolor, <i>Tinea cruris</i>
3	Masculino	1985	Serosite, pleurite	Nefrite, artrite, vasculite, pancitopenia, reação alérgica a contraste		<i>Rash malar</i> , púrpura, lesões cutâneas
4	Masculino	1972		HAS, linfopenia, rinite pigmentar, glomerulonefrite, Sd. Nefrótica		<i>Rash malar</i>
5	Masculino	1984	Serosite, miocardite	Nefrite, artrite, derrame pleural, derrame pericárdio, rinite, valvulite mitral, SAF		<i>Rash malar</i> , ptiíase
6	Feminino	1964	Sinusite, herpes <i>zoster</i> , pneumonia	Nefrite, artrite, gânglio axilar, leucocitúria, fibromialgia, leucopenia, otossesibilidade, diabetes <i>melitus</i> , GNMF focal, SAF, mucosite, artralgia,	Psicose	<i>Rash malar</i>
7	Feminino	1978	úlceras orais, virose trato respiratório alto	Nefrite, artrite, HAS, fotossensibilidade, fibromialgia, GNPD	Psicose lúpica, convulsão	<i>Rash malar</i> , LES cutâneo
8	Feminino	1966	Serosite, serosite pericárdio, herpes <i>zoster</i> , pleurite, pielonefrite, monolíase oral, diarreia aguda, estomatite, celulite, pústula hálux	Nefrite, derrame pleural, ascite, doença péptica, gastrite, esofagite, DPC, abscesso dentário, obesidade, FOP, osteoporose, SAF	Depressão, psicose, vasculite SNC	Verrugas palmares
9	Feminino	1962	ITU, pneumonia, pielonefrite, pneumonia bacteriana, diarreia	Nefrite, HAS, serosite, SAF, obesidade, TVP, TEP, GNPD, obesidade mórbida, Cushing iatrogênico, serosite cutâneo-articular, vulvovaginite, leucopenia, derrame pleural e pericárdio, DMII, LES hematológico, distúrbio coagulação, resistência insulínica	Ansiedade	<i>Rash malar</i> , Sd. Pós-trobótica em MIE, tromboflebite

10	Feminino	1951	Diarréia aguda infecciosa superior, sífilis tratada	Nefrite, artrite joelho, HAS, obesidade, pico hipertensivo, bócio difuso, doença de Graves, poliartrite, GNM	Sd. Climatério	Ptíriase versicolor, <i>Tinea corporis</i>
11	Feminino	1982	Serosite, ITU, sinusite, HPV, vulvovaginite	Nefrite, artrite, edema generalizado, fotossensibilidade, linfopenia, plaquetopenia, adenomegalia cervical, GNPD	Neuropsiquiátrico	<i>Rash malar</i> Pediculose, ptíriase versicolor, <i>Tinea corporis</i> , lúpus cutâneo
12	Feminino	1941	ITU, herpes <i>zoster</i> , furunculose, virose respiratória	Nefrite, artrite, artralgia, osteoartrite, HAS, gastrite medicamentosa, alopecia, constipação intestinal, lombociatalgia, leucorréia, arritmia supraventricular, neoplasia, hepatomegalia, obesidade, tosse alérgica, dispepsia, fibromialgia, dislipidemia, esofagite erosiva, IVAS	Distúrbio emocional, Sd, climatério	ManChAS no corpo, ptíriase versicolor, dermatite seborréica
13	Feminino	1961	Serosite, ITU, pneumonite, pericardite, pleuriteotite, vaginose	Nefrite IIB, osteoartrite, aborto, fibromialgia, derrame pleural, aborto de repetição, miomatose uterina, linfopenia, sobrepeso, granuloma em FSV, hiperatividade do detrusor	Transtorno do pânico, Sd. Climatério, cefaléia crônica diária, abuso analgésico, psicose	LED
14	Feminino	1950	Serosite, ITU	Nefrite, artrite, HAS, derrame pericárdio, fibromialgia, anemia ferrotípica, maculopatia por cloroquina, deslocamento retina, glaucoma agudo, coroidite secundária ao LES, doença diverticular colônica, fotossensibilidade, GNM	Neurocisticercose, transtorno depressivo	LES cutâneo
15	Feminino	1935	ITU, celulite, erisipela	Nefrite, HAS, pneumopatia, úlcera MIE, insuficiência vascular, úlcera flebopática, fotossensibilidade, ateromatose carótida, osteoporose, anemia, SAAF	Psicose	LES cutâneo/articular, LED, onicomicose
16	Feminino	1986	ITU, miosite, polimiosite, pneumoniasinusite maxilar, pneumonite	Nefrite, artrite crônica juvenil, poliartrite simétrica, monoartrite tornozelo hematuria, ascite, fibrose pulmonar, cistite hemorrágica, fibrose cardíaca, anemia hemolítica, fibromialgia, taquicardia	Crises convulsivas	Seborréia

17	Feminino	1963	HPV, sinusite, pielonefrite, celulite periorbitária	Nefrite, poliartralgia, poliartrite, HAS, leucopenia, vasculite, dor abdominal, monilíase vaginal, tendinite, DMTC, distímia, rinite, asma, fibromialgia, DRGE, fotossensibilidade, toxoplasmose,	Síndrome do pânico	<i>Rash malar</i>
18	Feminino	1974	Serosite (pleurite, pericardite), ITU, sinusite	Nefrite, artrite, lesão ocular por cloroquina, derrame pericárdio	Psicose	Dermatite de interface
19	Feminino	1977	Serosite, ITU	Nefrite, artrite, poliartrite, HAS, litíase renal, taquicardia episódica, vulvovaginite, cisto ovariano, anemia, fibromialgia,	LES neuropsiquiátrico	<i>Rash malar</i>
20	Feminino	1956	ITU	Nefrite, hematúria secundária nefrite, anemia secundária hematúria, fotossensibilidade, anemia hemolítica, fibromialgia, linfopenia, colecistite aguda, gastrite aguda	Labirintopatia	LES discóide
21	Feminino	1948	Serosite, sinusite, diarreia	Nefrite, artrite, poliartrite, HAS, Cushing medicamentoso, TBG, fibromialgia, tabagismo, alterações pulmonares residuais, necrose asséptica do úmero, osteopenia, fibromialgia	Depressão	Celulite em MIE
22	Feminino	1955	ITU	Nefrite, HAS, obesidade, fibromialgia, gastrite medicamentosa, tricomoniase, mioma, DMII, fotossensibilidade, etilismo, pé diabético infectado	Neuropatia secundária a talidamida, cefaleia	<i>Rash malar</i> , vasculite cutânea
23	Feminino	1963	Serosite (pleural, pericárdio), ITU, sífilis, celulite	Nefrite, artrite, hipertrofia mamária, DMTC, Sd. Raynaud, Cushing iatrogênico, pancreatite, fotossensibilidade, alterações hematológicas, varizes, hipertiroidismo, osteopenia, menopausa precoce, doença de Graves, lesão vulvar hiperplásica, derrame pericárdio, dislipidemia, sobrepeso	Transtorno ansiedade	Mioma submucoso

24	Masculino	1979	Serosite, herpes zoster, pneumonia, pericardite, pneumonite, hepatite B crônica, monoliase oral	Nefrite, artralgia, febre, adenomegalia, collagenase, derrame, pericárdio, leucopenia, febre, GNPd, SAF, AHAI	<i>Rash malar</i>
-----------	-----------	------	---	---	-------------------

Abreviaturas: AHAI - Anemia hemolítica autoimune; DMII – Diabetes mellitus tipo 2; DMTC - Doença mista do tecido conjuntivo; DRGE - Doença do refluxo gastroesofágico; FOP - Falência ovariana prematura; FSV - Fundo de saco vaginal; GN membranosa = GNM = Glomerulonefrite membranosa; GNMP - Glomerulonefrite membranoproliferativa; GNPd - Glomerulonefrite proliferativa difusa; HAS – Hipertensão arterial sistêmica; HPV - Papiloma vírus humano; ITU – Infecção do trato urinário ; IVAS - Infecção das vias aéreas superiores; LED – Lúpus eritematoso discóide ; LES – Lúpus eritematoso sistêmico ; MIE - Membro inferior esquerdo; SAAF – Síndrome do anticorpo antifosfolípido; SAF - Síndrome antifosfolípica; Sd. – Síndrome; SNC – Sistema nervosa central; TEP - Tromboembolismo pulmonar; TVP – Trombose venosa profunda

APÊNDICE 2

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP

PROJETO DE PESQUISA

Título: CNVs em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

Área Temática:

Pesquisador: Fernanda Bueno Barbosa

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

CAAE: 03199712.0.0000.5440

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 72493

Data da Relatoria: 08/09/2012

Apresentação do Projeto:

Identificação: projeto de pesquisa de mestrado a ser desenvolvido pela pesquisadora Fernanda Bueno Barbosa, graduada em ciências biológicas, sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem como objetivo geral promover uma análise em larga escala da existência da relação entre as CNVs com o risco de ocorrência de LES em amostras de população brasileira, o que permitirá atingir os seguintes objetivos específicos:

1. Comparar as CNVs encontradas em indivíduos saudáveis com as encontradas nos pacientes com LES;
2. Estimar a frequência em das CNVs identificadas;
3. Identificar novas CNVs no conjunto amostral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como uma avaliação dos possíveis benefícios decorrentes do desenvolvimento da pesquisa em tela, os pesquisadores afirmam que não há previsão de benefícios individuais aos doadores de amostras para realização deste projeto de pesquisa, entretanto, os resultados da pesquisa podem fornecer subsídio para compreensão das bases genéticas da doença e dos processos autoimunes.

A questão dos possíveis riscos foi abordada no relatório de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O genoma humano varia entre os indivíduos não somente ao nível de sequência, mas também estruturalmente. Duplicações e deleções podem resultar em alterações no número de cópias diploide dos segmentos genômicos. Isto é referido como variação no número de cópias (CNVs). As CNVs podem contribuir para a variabilidade do risco na etiologia das doenças complexas entre os indivíduos. A evidência disponível sugere que exista variação

em pelo menos 20 loci associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) que contribuem para a susceptibilidade à patogênese. Recentes estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) confirmaram loci previamente associados com LES, além de revelarem novas regiões gênicas relacionadas com a doença (Morris et al., 2010; Sanchez et al., 2011; Yu et al., 2011). Embora tenha ocorrido um progresso notável tanto em ensaios iniciais de GWAS e em estudos de genes alvo do LES, ainda existem lacunas significativas na compreensão da base genética da doença. Em termos de perspectivas futuras, o modelo de GWAS tem as suas limitações. Como esses estudos são baseados na associação com blocos haplotípicos

comuns, pode ocorrer a detecção de um marcador em forte desequilíbrio de ligação com a variante causal ao invés de identificar a variante causal real (Sanchez et al., 2011). A identificação recente de CNVs comuns no genoma humano como fonte de modificação genética pode explicar, em parte, a susceptibilidade à autoimunidade (Bronstad et al., 2011). METODOLOGIA: Neste projeto será analisado o perfil de CNVs de pacientes portadores de LES e um grupo controle de indivíduos saudáveis. Para isso, será realizado um ensaio de microarranjo, por meio da metodologia de SNP array. Serão estudados 24 pacientes e número equivalente de controles. O DNA de tais amostras se encontra extraído, uma vez que estas foram

utilizadas em outros projetos já executados ou em execução, todos previamente aprovados por Comissão de Ética. A detecção de variantes no número de cópias será realizada com a utilização da plataforma Affymetrix GeneChip System® (CytoScan HD), que permite a tipagem 2,6 milhões de CNVs e 700 mil SNPs. A leitura será feita pelo software Chromosome Analysis Suite (ChAS) e os dados gerados serão comparados com os bancos de dados disponíveis online. A determinação do padrão de CNVs para o grupo de pacientes e de controles inclui identificar as CNVs comuns, raras e novas. As frequências das CNVs relevantes encontradas nos pacientes serão comparadas com aquelas encontradas nos indivíduos saudáveis. As amostras dos pacientes portadores de LES foram anteriormente coletadas, mediante consentimento prévio, de pacientes atendidos e diagnosticados no ambulatório de Colagenases da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP, USP) para o projeto de pesquisa “Estudo da Neutropenia Em Pacientes Com Lúpus Eritematoso Sistêmico”, com o Professor Doutor Eduardo Antônio Donadi como responsável. O grupo controle foi escolhido entre as amostras pertencentes a indivíduos saudáveis, voluntários, não aparentados, de ambos os sexos, residentes da cidade de Ribeirão Preto, aprovadas pelo projeto “Tipagem de variantes nos genes associados à pigmentação de pele”, com o Professor Doutor Celso Teixeira Mendes Júnior como responsável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos: a) Folha de rosto, assinada pela pesquisadora responsável e pelo Vice-Diretor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; b) Projeto de Pesquisa na íntegra, com o orçamento detalhado, referências bibliográficas atuais e pertinentes, e cronograma coerente; c) carta de solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; d) anuência dos docentes Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi e Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes para utilização das amostras.

Recomendações:

Sem novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 13 de Agosto de 2012

Assinado por:
Ricardo de Carvalho Cavalli

Apêndice 3. Listas de genes incluídos nas *Cytoregions* no programa *ChAS*Lista 1: Genes relacionados com autoimunidade

Gene	Cromossomo	Referência
CDKAL1	1	[1]
FCGR1C	1	[2]
FCGR3B	1	[3]
IL23R	1	[4]
ITLN1	1	[1]
MMEL1	1	[5]
PADI4	1	[4]
PTPN22	1	[1]
RGS1	1	[1]
ATG16L1	2	[1]
CTLA4	2	[4]
IFIH1	2	[1]
IL18RAP	2	[1]
LRP1B	2	[2]
REL	2	[4]
STAT4	2	[4]
CCR3	3	[1]
H1FOO	3	[2]
IL12A	3	[1]
LPP	3	[1]
MST1	3	[1]
PLXND1	3	[2]
PXK	3	[1]
RHO	3	[2]
TBC1D5	3	[2]
IL2-IL21	4	[1]
NFKB1	4	[5]
UGT2B17	4	[2]
UGT2B28	4	[2]
CCR6	5	[1]
HSD17B4	5	[2]
IL12B	5	[1]
PTGER4	5	[1]
C13orf31	6	[1]
C4A	6	[3]
C4B	6	[3]
JAK2	6	[1]
TNFAIP3	6	[1]
BMPER	7	[2]

Gene	Cromossomo	Referência
IRF5	7	[4]
NCF1	7	[3]
ORMDL3	7	[1]
TYW1	7	[6]
ADAM3A	8	[2]
BLK	8	[4]
SCARA5	8	[2]
SNTG1	8	[6]
STAT3	8	[1]
ICOSLG	9	[1]
TRAF1-C5	9	[1]
IL2RA	10	[1]
NKX2-3	10	[1]
ZNF365	10	[1]
CXCR5	11	[5]
INS	11	[4]
ANKS1B	12	[6]
ERBB3	12	[1]
LRRK2	12	[1]
RASSF9	12	[2]
SH2B3	12	[1]
NFKBIA	14	[2]
TSHR	14	[4]
BCL8	15	[6]
GOLGA6L6	15	[6]
GOLGA8C	15	[6]
POTEB	15	[6]
CLEC16A	16	[1]
ITGAM	16	[1]
NOD2	16	[4]
CCL3L1	17	[3]
KIAA1267	17	[2]
TRIM16	17	[6]
PTPN2	18	[1]
SPIB	19	[5]
CD40	20	[4]
AIRE	21	[4]
FOXP3	X	[4]

Lista 2: Genes relacionados com LES

Gene	Cromossomo	Referência
C1Q	1	[7]
CFHR1-5	1	[8]
CRP	1	[8]
FCGR	1	[9]
FCGR2A	1	[8]
FCGR3B	1	[8]
IL10	1	[8]
NCF2	1	[9]
NMNAT2	1	[8]
PTPN22	1	[9]
TNFSF4	1	[9]
CD28	2	[10]
CXCR4	2	[10]
IFIH1	2	[9]
IL1RN	2	[10]
PDCD1	2	[7]
RASGRP3	2	[9]
STAT1	2	[7]
STAT4	2	[9]
PXK	3	[9]
TREX1	3	[8]
BANK1	4	[9]
IL2	4	[8]
IL21	4	[8]
IL4	5	[10]
MIR146A	5	[8]
TNIP1	5	[9]
ATG5	6	[9]
C2	6	[7]
C4A	6	[7]
C4B	6	[7]
HLA	6	[8]
PRDM1	6	[9]

Gene	Cromossomo	Referência
TNFAIP3	6	[9]
UHRF1BP1	6	[9]
ICA1	7	[8]
IKZF1	7	[9]
IL6	7	[10]
IRF5	7	[9]
JAZF1	7	[9]
BLK	8	[9]
FAM167A	8	[7]
IKBKB	8	[8]
LYN	8	[9]
XKR6	8	[9]
LRRC18	10	[9]
WDFY4	10	[9]
CD44	11	[9]
ETS1	11	[9]
IRF7	11	[9]
KIAA1542	11	[8]
PHRF1	11	[8]
SLC15A4	12	[9]
ELF1	13	[8]
IRF8	16	[9]
ITGAM	16	[9]
PRKCB	16	[8]
TYK2	19	[9]
CD40	20	[8]
UBE2L3	22	[9]
IRAK1	X	[8]
MECP2	X	[8]
TLR7	X	[8]

Lista 3: Genes encontrados em CNVs relacionadas com LES

Gene	Cromossomo	Referência
FCGR3B	1	[11, 12, 13]
IL-21	4	[14]
C4A	6	[15,16]
C4B	6	[15,16]
IL-17F	6	[14]
IL-22	12	[14]

Referências das listas

1. Lettre, G. and J.D. Rioux, *Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies*. Human molecular genetics, 2008. **17**(R2): p. R116-R121.
2. Bronstad, I., et al., *Genome-wide copy number variation (CNV) in patients with autoimmune Addison's disease*. BMC medical genetics, 2011. **12**(1): p. 111.
3. Olsson, L.M. and R. Holmdahl, *Copy number variation in autoimmunity: importance hidden in complexity?* European Journal of Immunology, 2012. **42**(8): p. 1969-1976.
4. Gregersen, P.K. and T.W. Behrens, *Genetics of autoimmune disease: disorders of immune homeostasis*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**(12): p. 917-928.
5. Smyk, D.S., et al., *Rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis: cause, consequence, or coincidence?* Arthritis, 2012. **2012**.
6. Grayson, B.L., et al., *Genome-wide analysis of copy number variation in type 1 diabetes*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e15393.
7. Harley, I.T.W., et al., *Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(5): p. 285-290.
8. Vaughn, S.E., et al., *Genetic susceptibility to lupus: the biological basis of genetic risk found in B cell signaling pathways*. Journal of Leukocyte Biology, 2012. **92**(3): p. 577-591.
9. Guerra, S.G., T.J. Vyse, and D.S.C. Graham, *The genetics of lupus: a functional perspective*. enzyme, 2012. **2**: p. 3.
10. Chai, H.C., M.E. Phipps, and K.H. Chua, *Genetic Risk Factors of Systemic Lupus Erythematosus in the Malaysian Population: A Minireview*. Clinical and Developmental Immunology, 2012. **2012**.
11. Molokhia, M., et al., *FCGR3B copy number variation is associated with systemic lupus erythematosus risk in Afro-Caribbeans*. Rheumatology, 2010. **50**(7): p. 1206-1210.

12. Morris, D.L., et al., *Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus*. European Journal of Human Genetics, 2010. **18**(9): p. 1027-1031.
13. Mueller, M., et al., *Genomic Pathology of SLE-Associated Copy-Number Variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2BLocus*. The American Journal of Human Genetics, 2013.
14. Yu, B., et al., *Copy number variations of interleukina17F, interleukina21, and interleukina22 are associated with systemic lupus erythematosus*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(11): p. 3487-3492.
15. Yang, Y., et al., *Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans*. The American Journal of Human Genetics, 2007. **80**(6): p. 1037-1054.
16. Wu, Y., et al., *Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus*. Cytogenetic and genome research, 2008. **123**(1-4): p. 131-141.

Apêndice 4. Tabela representando o total de *CNVs* detectadas nos pacientes com LES

CNV ID	Paciente	Localização Genômica				Tipo	CN State	Tamanho (kb)	Nº de marcadores	Genes
		Cromossomo	Citobanda	Início	Fim					
1	1	1	q44	248753332	248795277	Deleção	1	41,9	56	OR2T10, OR2T11
2	1	3	p21.1	53031722	53038786	Deleção	1	7,1	32	SFMBT1
3	1	4	q35.1	185799622	185860319	Duplicação	3	60,7	50	-
4	1	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
5	1	10	q11.22	46996612	47056291	Duplicação	3	59,7	59	GPRIN2
6	1	10	q26.3	135228992	135377075	Duplicação	3	148,1	245	MTG1, SPRN, LOC619207, CYP2E1, SYCE1
7	1	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	1	25,3	48	OR52N5, OR52N1
8	1	11	p15.1	18941196	18971367	Duplicação	3	30,2	68	MRGPRX1
9	1	11	p11.12	49712522	49746642	Deleção	1	34,1	34	LOC440040
10	1	12	p11.23	27646150	27659531	Deleção	1	13,4	28	C12orf70
11	1	14	q32.33	106329183	106876355	Duplicação	3	547,2	120	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
12	1	15	q11.2	25430385	25420014	Deleção	1	10,4	29	SNORD115-3, SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-10, SNORD115-12, SNORD115-9, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8

13	1	17	q21.31	44190670	44288442	Duplicação	3	97,8	100	KIAA1267, LOC644246
14	1	19	q13.2	41352688	41392142	Deleção	1	39,5	46	CYP2A6, CYP2A7
15	1	X	p22.33	1223287	1234634	Deleção	1	11,3	40	-
16	1	X	p22.33	1793059	1818776	Duplicação	3	25,7	52	-
17	1	X	p11.22	53475174	53488727	Deleção	0	13,6	100	-
18	2	1	q44	248753332	248794396	Deleção	1	41,1	52	OR2T10, OR2T11
19	2	4	q28.3	134924033	135191179	Deleção	1	267,1	159	PABPC4L
20	2	5	q35.3	180378753	180418090	Deleção	1	39,3	34	BTNL3
21	2	6	p25.3	254253	294826	Deleção	1	40,6	88	DUSP22
22	2	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
23	2	12	p11.23	27646150	27659531	Deleção	1	13,4	28	C12orf70
24	2	14	q32.33	106329183	106728149	Duplicação	3	399,0	72	KIAA0125, ADAM6
25	2	15	q14	34929954	34975073	Deleção	1	45,1	43	-
26	2	19	p13.12	15777995	15820325	Duplicação	3	42,3	63	CYP4F12
27	2	X	q27.1	139493671	139504489	Deleção	0	10,8	72	-
28	3	1	q21.3	152761910	152773905	Deleção	1	12,0	28	LCE1D
29	3	2	p22.3	35926022	35997473	Deleção	1	71,5	40	-
30	3	3	p21.31	46780900	46813059	Deleção	1	32,2	40	PRSS45
31	3	3	q12.2	100340054	100442497	Duplicação	3	102,4	108	GPR128, TFG
32	3	3	q24	145626200	145662453	Deleção	1	36,3	30	-

33	3	3	q28	189360266	189371964	Deleção	1	11,7	40	TP63
34	3	6	q12	66399523	66407209	Deleção	1	7,7	28	EYS
35	3	6	q14.1	78962580	79035161	Deleção	1	72,6	25	-
36	3	11	q11	55374175	55452996	Deleção	1	78,8	96	OR4P4, OR4S2, OR4C6
37	3	13	q21.1	57758376	57776590	Deleção	1	18,2	28	-
38	3	14	q11.2	22633667	22688302	Deleção	1	54,6	112	-
39	3	14	q11.2	22730927	22938126	Deleção	1	207,2	288	-
40	3	14	q32.33	106207204	106931309	Duplicação	3	724,1	266	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
41	3	17	q12	36283806	36404136	Deleção	1	120,3	28	TBC1D3F, TBC1D3
42	3	19	q13.42	55283915	55347661	Deleção	1	63,7	28	KIR3DP1, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4
43	3	X	p22.33	784132	837407	Deleção	1	53,3	117	-
44	3	X	p22.33	1793056	1818776	Duplicação	3	25,7	55	-
45	3	X	q27.1	139493805	139504489	Deleção	0	10,7	60	-
46	4	6	q14.1	78962580	79035172	Deleção	1	72,6	26	-
47	4	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
48	4	12	q23.1	99791778	99798721	Deleção	1	6,9	32	ANKS1B
49	4	14	q32.33	106329183	106728149	Duplicação	3	399,0	72	KIAA0125, ADAM6
50	4	14	q32.33	107150443	107184184	Duplicação	3	33,7	66	-
51	5	1	p31.3	68490069	68502895	Deleção	1	12,8	48	-

52	5	1	q21.3	152259841	152306921	Deleção	1	47,1	36	FLG
53	5	2	p16.3	50369634	50384213	Deleção	1	14,6	39	NRXN1
54	5	2	q11.2	97858137	97878057	Deleção	1	19,9	28	ANKRD36
55	5	2	q34	213163737	213178030	Deleção	1	14,3	72	ERBB4
56	5	3	p24.1	28360091	28402320	Deleção	1	42,2	34	CMC1, AZI2
57	5	3	p21.31	46793363	46849576	Deleção	1	56,2	47	-
58	5	3	p12.3	77565380	77577207	Deleção	1	11,8	27	ROBO2
59	5	3	p12.2	81559499	81576967	Deleção	1	17,5	35	GBE1
60	5	4	q13.2	69435888	69540420	Deleção	1	104,5	48	UGT2B15
61	5	5	p12	45915731	46365514	Deleção	1	449,8	130	-
62	5	5	q21.1	100719862	100761775	Deleção	1	41,9	32	-
63	5	5	q33.2	154834014	154878178	Deleção	1	44,2	40	-
64	5	6	p25.3	1966835	2071120	Duplicação	3	104,3	123	GMDS
65	5	6	p21.32	32688023	32708890	Deleção	1	20,9	48	-
66	5	6	q12	64685861	64703901	Deleção	1	18,0	33	EYS
67	5	6	q12	65037075	65068777	Deleção	1	31,7	28	EYS
68	5	6	q14.1	78962625	79060009	Deleção	1	97,4	43	-
69	5	6	q14.1	82406876	82426708	Deleção	1	19,8	32	-
70	5	6	q16.1	94032409	94058581	Deleção	1	26,2	46	EPHA7
71	5	7	p21.3	8576628	8601956	Deleção	1	25,3	27	NXPH1

72	5	7	p21.3	8824416	8865997	Deleção	1	41,6	40	-
73	5	7	q31.1	114209440	114215739	Deleção	1	6,3	28	FOXP2
74	5	8	p22	15517524	15530708	Deleção	1	13,2	28	TUSC3
75	5	8	p11.22	39247097	39352609	Deleção	1	105,5	52	ADAM5P, ADAM3A
76	5	8	p11.1	43424102	43736876	Deleção	1	312,8	82	-
77	5	8	q11.1	47259429	47457980	Deleção	1	198,6	67	-
78	5	9	p21.1	31185861	31206711	Deleção	1	20,9	39	-
79	5	9	q33.1	121984102	121996379	Deleção	1	12,3	40	DBC1
80	5	9	q34.2	137354612	137529641	Duplicação	3	175,0	133	-
81	5	10	q21.1	58330866	58482756	Deleção	1	151,9	120	-
82	5	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	1	25,3	48	OR52N5, OR52N1
83	5	11	p11.2	48783129	48892181	Deleção	1	109,1	28	-
84	5	11	p11.12	50344786	51267021	Deleção	1	922,2	129	LOC646813
85	5	11	q11	55376497	55442305	Deleção	1	65,8	72	OR4P4, OR4S2, OR4C6
86	5	11	q14.1	84159356	84183411	Deleção	1	24,1	28	DLG2
87	5	11	q25	134922399	134938470	Deleção	1	16,1	26	-
88	5	12	p13.1	13859810	13885432	Deleção	1	25,6	32	GRIN2B
89	5	12	p11.1	34559318	34749005	Deleção	1	189,7	40	-
90	5	12	q21.33	91442500	91454575	Deleção	1	12,1	32	KERA
91	5	12	q23.1	99791638	99798721	Deleção	1	7,1	34	ANKS1B

92	5	13	q31.3	93378273	93386333	Deleção	1	8,1	32	GPC5
93	5	13	q31.3	94506273	94515199	Deleção	1	8,9	55	GPC6
94	5	14	q32.33	106329183	106717343	Duplicação	3	388,2	64	KIAA0125, ADAM6
95	5	15	q15.3	43888261	43984930	Deleção	1	96,7	76	CKMT1B, STRC, CATSPER2
96	5	16	p13.3	3223992	3323432	Duplicação	3	99,4	123	OR1F1, OR1F2P, ZNF200, MEFV, FLJ39639
97	5	17	q12	36283806	36410559	Deleção	1	126,8	32	TBC1D3F, TBC1D3
98	5	17	q21.31	44212823	44784639	Duplicação	3	571,8	72	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
99	5	X	p22.33	1793059	1818776	Duplicação	3	25,7	52	-
100	5	X	q27.1	139493671	139504489	Deleção	0	10,8	72	-
101	5	X	q28	153421784	153437615	Deleção	0	15,8	30	OPN1LW
102	6	1	q24.2	167675707	167705358	Deleção	1	29,7	28	MPZL1
103	6	3	p21.31	46801991	46832069	Deleção	1	30,1	33	-
104	6	6	p25.3	254253	294826	Deleção	1	40,6	88	DUSP22
105	6	6	q12	67011364	67051189	Deleção	1	39,8	28	-
106	6	7	p22.3	154720	158615	Deleção	0	3,9	28	-
107	6	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	0	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
108	6	11	p15.4	5783909	5812365	Deleção	1	28,5	52	OR52N5, OR52N1
109	6	11	q11	55376497	55442305	Deleção	1	65,8	72	OR4P4, OR4S2, OR4C6

110	6	14	q32.33	106274525	106728149	Duplicação	3	453,6	138	KIAA0125, ADAM6
111	6	15	q11.2	24363482	24485873	Deleção	1	122,4	105	PWRN2
112	6	17	q21.31	44187491	44784639	Duplicação	4	597,1	108	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
113	6	X	p22.33	354464	401509	Duplicação	3	47,0	64	-
114	7	1	q31.3	196827841	196877037	Deleção	1	49,2	60	CFHR4
115	7	1	q44	248753183	248794396	Deleção	1	41,2	54	OR2T10, OR2T11
116	7	8	p11.22	39247097	39384956	Deleção	1	137,9	74	ADAM5P, ADAM3A
117	7	9	q34.3	138139988	138240551	Duplicação	3	100,6	58	-
118	7	11	p11.12	50480770	51228126	Deleção	1	747,4	52	-
119	7	14	q32.33	106329183	106728149	Duplicação	3	399,0	72	KIAA0125, ADAM6
120	7	15	q11.2	25421329	25430243	Deleção	1	8,9	26	SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-10, SNORD115-12, SNORD115-9, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8
121	7	16	q12.2	55796375	55821956	Deleção	1	25,6	29	CES1P1
122	7	17	q21.2	39517068	39526296	Deleção	1	9,2	28	KRT33B
123	7	17	q21.31	44187491	44784639	Duplicação	4	597,1	108	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
124	7	19	q13.2	41352688	41376007	Deleção	1	23,3	41	CYP2A6

125	7	20	q13.2	52652464	52658506	Deleção	1	6,0	26	BCAS1
126	7	X	p22.31	6634452	6642670	Deleção	1	8,2	28	-
127	7	X	q23	115133388	115156164	Deleção	1	22,8	36	-
128	7	X	q26.3	134874630	134891198	Deleção	1	16,6	28	CT45A4, CT45A3
129	8	2	q34	213181329	213192832	Deleção	1	11,5	39	ERBB4
130	8	3	p21.31	46801803	46849576	Deleção	1	47,8	46	-
131	8	5	p15.31	6325587	6328043	Deleção	1	2,5	28	FLJ33360
132	8	9	q21.11	72098584	72127165	Duplicação	3	28,6	72	APBA1
133	8	12	p13.2	11219929	11251861	Deleção	1	31,9	37	PRR4, PRH1, TAS2R43
134	8	13	q21.1	57750940	57776590	Deleção	1	25,7	36	-
135	8	13	q33.1	104521177	104647267	Deleção	1	126,1	112	-
136	8	14	q32.33	106329183	106709974	Duplicação	3	380,8	56	KIAA0125, ADAM6
137	8	17	q21.31	44212823	44276618	Duplicação	3	63,8	64	KIAA1267, LOC644246
138	8	22	q12.1	29079237	29115517	Duplicação	3	36,3	52	CHEK2
139	8	X	p22.33	2521636	2533169	Deleção	1	11,5	26	CD99P1
140	8	X	q26.1	129375241	129376465	Deleção	1	1,2	28	ZNF280C
141	8	X	q27.1	139919015	139920849	Deleção	1	1,8	36	-
142	8	X	q28	147317018	147324256	Deleção	1	7,2	26	-
143	9	3	p11.1	89387087	89419367	Deleção	1	32,4	50	EPHA3
144	9	5	q15	96625630	96865984	Deleção	1	240,4	148	-

145	9	5	q35.3	180378753	180430789	Deleção	1	52,0	36	BTNL3
146	9	6	p25.3	254253	381137	Duplicação	3	126,9	228	DUSP22
147	9	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
148	9	11	p15.1	18941196	18971367	Duplicação	3	30,2	68	MRGPRX1
149	9	14	q32.33	106329183	106717343	Duplicação	3	388,2	64	KIAA0125, ADAM6
150	9	14	q32.33	107150443	107179594	Duplicação	3	29,2	64	-
151	9	16	p11.2	32554241	33754119	Duplicação	3	1.199,9	120	TP53TG3B, TP53TG3, SLC6A10P, LOC390705
152	9	20	p11.21	23727144	23796651	Deleção	1	69,5	85	CST1
153	9	X	q28	147115311	147117511	Deleção	1	2,2	40	-
154	10	2	q21.2	133280686	133317266	Duplicação	3	36,6	52	GPR39
155	10	2	q33.1	203293011	203313469	Deleção	1	20,5	96	BMPR2
156	10	6	q14.1	78866468	79051614	Duplicação	3	185,1	112	-
157	10	6	q25.1	152303218	152311895	Deleção	1	8,7	31	ESR1
158	10	7	p22.3	154720	158615	Deleção	1	3,9	28	-
159	10	7	q21.11	85522989	85709099	Deleção	1	186,1	112	-
160	10	7	q35	146859536	146868357	Deleção	1	8,8	28	CNTNAP2
161	10	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
162	10	10	q26.3	135357299	135427143	Duplicação	3	69,8	83	SYCE1, SPRNP1
163	10	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	1	25,3	48	OR52N5, OR52N1
164	10	11	p15.4	7809464	7837000	Deleção	1	27,5	28	OR5P2

165	10	12	p11.21	31265043	31407111	Duplicação	3	142,1	56	-
166	10	14	q32.33	106329183	106849677	Duplicação	3	520,5	108	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
167	10	19	p13.12	15779310	15833442	Duplicação	3	54,1	67	CYP4F12
168	10	X	p22.2	10630413	10632537	Deleção	1	2,1	72	MID1
169	10	X	q23	115138899	115156164	Deleção	1	17,3	28	-
170	10	X	q26.3	134928992	134966528	Duplicação	4	37,5	104	CT45A4, CT45A5, CT45A6
171	11	1	q44	248759244	248795277	Deleção	1	36,0	44	OR2T11
172	11	3	p21.31	46793363	46849576	Deleção	1	56,2	47	-
173	11	6	p25.3	257048	294826	Deleção	1	37,8	86	DUSP22
174	11	6	p25.3	294910	381137	Duplicação	3	86,2	140	DUSP22
175	11	6	q14.1	78969091	79041720	Deleção	1	72,6	26	-
176	11	8	p12	30079990	30202711	Duplicação	3	122,7	92	-
177	11	8	p11.22	39258175	39384337	Deleção	1	126,2	60	ADAM5P, ADAM3A
178	11	9	p23	10546813	10586837	Deleção	1	40,0	92	PTPRD
179	11	10	q26.3	135371134	135427143	Duplicação	3	56,0	69	SYCE1, SPRNP1
180	11	11	p15.4	5788078	5809230	Deleção	0	21,2	44	OR52N5, OR52N1
181	11	11	q11	55402800	55452996	Deleção	1	50,2	76	OR4P4, OR4S2, OR4C6
182	11	12	p12.1	21796951	22445614	Duplicação	3	648,7	783	LDHB, KCNJ8, ABCC9, CMAS, ST8SIA1
183	11	14	q32.33	106329183	106728149	Duplicação	3	399,0	72	KIAA0125, ADAM6

184	11	17	q12	34447401	34465088	Deleção	1	17,7	36	-
185	11	19	p12	20588836	20711751	Deleção	1	122,9	81	ZNF826P
186	11	22	q13.33	51104037	51115526	Deleção	1	11,5	48	SHANK3
187	11	X	p22.33	1459623	1469501	Deleção	1	9,9	29	IL3RA
188	11	X	p22.2	15723836	15831401	Duplicação	3	107,6	116	CA5B, INE2, ZRSR2
189	11	X	q26.3	134928992	134966528	Duplicação	4	37,5	104	CT45A4, CT45A5, CT45A6
190	11	X	q27.1	139804197	139806255	Deleção	1	2,1	36	-
191	12	1	q31.3	196964969	196987806	Deleção	1	22,8	26	CFHR5
192	12	1	q44	248688586	248794396	Deleção	1	105,8	56	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11
193	12	3	p24.2	26046360	26169924	Deleção	1	123,6	64	-
194	12	3	q28	189363665	189371964	Deleção	1	8,3	32	TP63
195	12	7	p22.3	154720	158615	Deleção	1	3,9	28	-
196	12	7	p21.3	11983316	12078163	Duplicação	3	94,8	88	-
197	12	7	q22.1	100976195	101122851	Duplicação	3	146,7	112	EMID2
198	12	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
199	12	11	q11	55402800	55442305	Deleção	1	39,5	56	OR4P4, OR4S2, OR4C6
200	12	12	p11.21	31356048	31407111	Duplicação	3	51,1	52	-
201	12	17	q21.31	44212823	44784639	Duplicação	3	571,8	72	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
202	12	19	q13.2	41352688	41376006	Deleção	1	23,3	40	CYP2A6

203	12	X	q26.3	134693544	134694402	Deleção	1	0,9	39	DDX26B
204	12	X	q28	147317018	147325589	Deleção	1	8,6	44	-
205	13	5	p11	46246499	46377314	Deleção	1	130,8	27	-
206	13	5	q35.3	180378753	180430789	Deleção	1	52,0	36	BTNL3
207	13	6	p25.3	254282	294826	Deleção	1	40,5	87	DUSP22
208	13	7	q22.1	100968362	101141867	Duplicação	3	173,5	140	EMID2
209	13	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	0	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
210	13	8	q13.3	72210736	72216588	Deleção	1	5,9	26	EYA1
211	13	11	p11.2	48658169	48844411	Deleção	1	186,2	40	-
212	13	11	q11	54701631	55039246	Deleção	1	337,6	112	TRIM48
213	13	12	q23.1	99795759	99798721	Deleção	1	3,0	28	ANKS1B
214	13	14	q32.33	106329183	106709974	Duplicação	4	380,8	56	KIAA0125, ADAM6
215	13	15	q25.3	87830571	87878603	Deleção	1	48,0	44	-
216	13	19	p12	20588836	20830021	Deleção	1	241,2	192	ZNF826P, ZNF737, ZNF626
217	13	22	q11.23	25066486	25112325	Deleção	1	45,8	40	-
218	13	X	p22.33	356232	401509	Duplicação	3	45,3	60	-
219	13	X	q26.1	129375241	129376465	Deleção	1	1,2	28	ZNF280C
220	13	X	q26.3	134718783	134739030	Deleção	1	20,2	72	-
221	13	X	q26.3	134747838	134749413	Deleção	1	1,6	26	-
222	14	3	q13.32	118719894	118820510	Duplicação	4	100,6	96	IGSF11

223	14	3	q28	189363665	189371964	Deleção	1	8,3	32	TP63
224	14	4	q32.3	168808499	168992441	Deleção	1	183,9	108	-
225	14	5	q35.3	180378753	180418090	Deleção	1	39,3	34	BTNL3
226	14	6	p25.3	254253	381137	Deleção	1	126,9	228	DUSP22
227	14	7	p14.1	38325923	38349129	Deleção	1	23,2	52	-
228	14	7	q34	142466348	142485841	Deleção	0	19,5	40	TRY6, PRSS2
229	14	8	p11.22	39247097	39389003	Deleção	1	141,9	80	ADAM5P, ADAM3A
230	14	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	1	25,3	48	OR52N5, OR52N1
231	14	14	q11.2	22690190	22944507	Deleção	1	254,3	380	-
232	14	14	q32.33	106342422	106728149	Duplicação	3	385,7	70	KIAA0125, ADAM6
233	14	16	p11.2	34471297	34755816	Duplicação	3	284,5	172	LOC283914, LOC146481, LOC100130700
234	14	16	q12.2	55796375	55816692	Deleção	1	20,3	28	CES1P1
235	14	17	q21.31	44190670	44784639	Duplicação	3	594,0	104	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
236	14	X	q22.3	107110721	107116799	Deleção	1	6,1	36	MID2
237	14	X	q26.1	129375241	129383108	Deleção	1	7,9	29	ZNF280C
238	15	1	q32.2	210604980	210612839	Deleção	1	7,9	30	HHAT
239	15	4	q13.2	69435888	69540420	Deleção	0	104,5	48	UGT2B15
240	15	5	q35.3	180378775	180418090	Deleção	1	39,3	33	BTNL3
241	15	6	p21.31	35505363	35569236	Duplicação	3	63,9	58	FKBP5

242	15	7	p22.3	154720	158615	Deleção	1	3,9	28	-
243	15	7	q31.1	111049866	111083053	Deleção	1	33,2	28	IMMP2L
244	15	7	q36.2	154885133	154887762	Deleção	1	2,6	36	-
245	15	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
246	15	11	q11	55374018	55452996	Deleção	1	79,0	100	OR4P4, OR4S2, OR4C6
247	15	12	p11.23	27646150	27659531	Deleção	1	13,4	28	C12orf70
248	15	14	q32.2	99181303	99197359	Deleção	1	16,1	28	C14orf177
249	15	X	p22.33	1378501	1506308	Duplicação	4	127,8	78	CSF2RA, IL3RA, SLC25A6
250	15	X	q24	119137289	119153785	Deleção	1	16,5	34	-
251	15	X	q27.1	139804197	139806255	Deleção	1	2,1	36	-
252	16	1	p36.33	1400201	1467485	Deleção	1	67,3	34	ATAD3C, ATAD3B, ATAD3A
253	16	2	q34	213173378	213192832	Deleção	1	19,5	72	ERBB4
254	16	3	p14.1	65517399	65595008	Duplicação	3	77,6	128	MAGI1
255	16	4	p12	46103404	46124667	Deleção	1	21,3	28	GABRG1
256	16	5	q21.2	104433580	104498041	Deleção	1	64,5	60	RAB9BP1
257	16	8	p23.2	6015415	6045397	Deleção	1	30,0	30	-
258	16	8	p11.22	39225874	39386952	Deleção	1	161,1	84	ADAM5P, ADAM3A
259	16	8	q22.3	102388024	102408295	Deleção	1	20,3	48	-
260	16	8	q24.23	137689301	137862435	Deleção	1	173,1	112	-
261	16	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	1	25,3	48	OR52N5, OR52N1

262	16	13	q21.1	57758376	57778367	Deleção	1	20,0	32	-
263	16	14	q32.33	106246288	106761968	Duplicação	3	515,7	202	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
264	16	22	q11.22	23124497	23183112	Duplicação	3	58,6	56	MIR650
265	16	X	p22.33	356232	401509	Duplicação	3	45,3	60	-
266	16	X	p22.33	538788	570992	Duplicação	3	32,2	110	-
267	16	X	p22.33	817312	837452	Deleção	1	20,1	56	-
268	16	X	p22.33	1793055	1812233	Deleção	1	19,2	36	-
269	16	X	p22.33	2295258	2302145	Deleção	1	6,9	32	DHRX
270	16	X	p22.33	2370149	2382966	Deleção	1	12,8	64	DHRX
271	16	X	p22.31	6621971	6634382	Duplicação	3	12,4	68	-
272	16	X	p21.3	29114199	29117748	Deleção	1	3,5	27	IL1RAPL1
273	16	X	p11.23	49713119	49721454	Deleção	1	8,3	36	CLCN5
274	16	X	p11.22	53475174	53479503	Deleção	1	4,3	34	-
275	16	X	q21.1	77904920	77968206	Deleção	1	63,3	56	ZCCHC5
276	16	X	q21.32	92302268	92387213	Deleção	1	84,9	38	-
277	16	X	q23	115133388	115163259	Deleção	1	29,9	76	-
278	16	X	q23	115751421	115754656	Deleção	1	3,2	36	-
279	16	X	q26.3	133643248	133654688	Deleção	1	11,4	26	-
280	16	X	q26.3	136638059	136667227	Duplicação	4	29,2	84	ZIC3
281	16	X	q27.1	139493361	139497990	Duplicação	4	4,6	51	-

282	16	X	q28	154918771	154946935	Deleção	0	28,2	33	-
283	17	3	p11.1	89407024	89416364	Deleção	1	9,3	29	EPHA3
284	17	6	p25.3	257048	294712	Duplicação	3	37,7	82	DUSP22
285	17	6	q12	67009022	67051189	Deleção	1	42,2	30	-
286	17	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
287	17	11	p15.1	18941196	18961268	Deleção	1	20,1	48	MRGPRX1
288	17	13	q31.1	84106471	84155572	Deleção	1	49,1	49	-
289	17	14	q21.1	41608615	41695300	Deleção	1	86,7	28	-
290	17	14	q32.33	106273119	106328303	Duplicação	3	55,2	68	-
291	17	14	q32.33	106329183	106710077	Duplicação	3	380,9	58	KIAA0125, ADAM6
292	17	17	q21.31	44188450	44784639	Duplicação	3	596,2	105	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF
293	17	20	p12.1	15107160	15130400	Deleção	0	23,2	27	MACROD2
294	17	X	p11.22	52833688	52904643	Duplicação	3	71,0	80	XAGE5, XAGE3
295	17	X	q26.3	134928992	134966528	Duplicação	4	37,5	104	CT45A4, CT45A5, CT45A6
296	18	1	q32.2	210604732	210612839	Deleção	1	8,1	32	HHAT
297	18	3	p21.31	46801991	46849576	Deleção	1	47,6	45	-
298	18	4	p15.1	34773540	34831805	Deleção	1	58,3	25	-
299	18	4	q24	104199891	104251349	Deleção	1	51,5	37	-
300	18	6	q12	67004972	67048629	Deleção	1	43,7	30	-

301	18	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
302	18	8	q24.22	134145522	134183087	Deleção	1	37,6	40	TG
303	18	12	p13.2	11217136	11256728	Deleção	1	39,6	42	PRR4, PRH1, TAS2R43
304	18	14	q23.3	67193022	67217571	Deleção	1	24,5	41	GPHN
305	18	14	q32.33	106329183	106746713	Duplicação	3	417,5	80	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
306	18	17	q21.2	39511103	39522403	Deleção	1	11,3	32	KRT33B
307	18	19	q13.31	44896886	44938778	Deleção	1	41,9	60	ZNF285, ZNF229
308	18	19	q13.42	54718076	54752217	Deleção	1	34,1	34	LILRB3, LILRA6
309	18	X	p22.33	986336	995026	Deleção	1	8,7	28	-
310	18	X	q11.2	64419018	64664114	Deleção	1	245,1	86	-
311	19	1	p36.33	1621773	1672591	Deleção	0	50,8	38	CDK11B, SLC35E2B, MMP23A, CDK11A, SLC35E2
312	19	1	q44	248755341	248795277	Deleção	1	39,9	48	OR2T10, OR2T11
313	19	2	p22.3	34219274	34313413	Deleção	1	94,1	58	-
314	19	2	q33.1	203295762	203313469	Deleção	1	17,7	92	BMPR2
315	19	4	q13.2	69435966	69540420	Deleção	1	104,5	46	UGT2B15
316	19	5	q23.1	115586765	115625244	Deleção	1	38,5	56	COMMD10
317	19	6	p25.3	254282	294826	Deleção	1	40,5	87	DUSP22
318	19	6	q12	67004972	67051189	Deleção	1	46,2	32	-
319	19	7	p14.1	38319295	38349129	Deleção	1	29,8	64	-

320	19	7	q34	142453878	142485841	Deleção	1	32,0	52	PRSS1, TRY6, PRSS2
321	19	11	q11	55374175	55452996	Deleção	1	78,8	96	OR4P4, OR4S2, OR4C6
322	19	12	q23.1	99795454	99798721	Deleção	1	3,3	30	ANKS1B
323	19	13	q21.1	57750940	57776590	Deleção	0	25,7	36	-
324	19	14	q11.2	22578241	22937656	Deleção	1	359,4	580	-
325	19	14	q32.33	106329183	107179594	Duplicação	3	850,4	356	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226, NCRNA00221
326	19	19	q13.2	41352625	41385370	Deleção	1	32,7	46	CYP2A6, CYP2A7
327	19	X	p22.33	2295258	2302145	Deleção	1	6,9	32	DHR SX
328	19	X	p21.1	32742109	32743344	Deleção	1	1,2	32	DMD
329	19	X	q24	118878058	118889061	Deleção	1	11,0	61	-
330	19	X	q25	120973848	121005062	Deleção	1	31,2	26	-
331	19	X	q26.3	133642080	133654661	Deleção	1	12,6	29	-
332	19	X	q26.3	134675739	134947464	Duplicação	3	271,7	899	DDX26B, CT45A1, CT45A2, CT45A4, CT45A3, CT45A5
333	19	X	q28	147317018	147325589	Deleção	1	8,6	44	-
334	20	1	q44	248753332	248795277	Deleção	1	41,9	56	OR2T10, OR2T11
335	20	2	p22.2	36932842	36964864	Deleção	1	32,0	45	VIT
336	20	3	p11.1	89407024	89416364	Deleção	1	9,3	29	EPHA3
337	20	6	p25.3	254253	294826	Deleção	1	40,6	88	DUSP22
338	20	6	p21.33	31256082	31265971	Deleção	1	9,9	36	-

339	20	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
340	20	11	p15.4	5783909	5809230	Deleção	0	25,3	48	OR52N5, OR52N1
341	20	12	p13.2	11216816	11251705	Deleção	1	34,9	40	PRR4, PRH1, TAS2R43
342	20	12	q23.1	99791757	99798721	Deleção	1	7,0	33	ANKS1B
343	20	15	q11.2	24457662	24478240	Deleção	1	20,6	34	-
344	20	X	q21.31	88976798	89028374	Deleção	1	51,6	27	-
345	20	X	q23	115576235	115589080	Deleção	1	12,8	52	SLC6A14
346	20	X	q26.3	134928992	134966528	Duplicação	4	37,5	104	CT45A4, CT45A5, CT45A6
347	21	1	q21.1	145014996	145069305	Duplicação	3	54,3	92	PDE4DIP
348	21	1	q21.3	152761910	152773905	Deleção	1	12,0	28	LCE1D
349	21	2	q34	213181314	213192832	Deleção	1	11,5	40	ERBB4
350	21	3	q13.33	120466531	120481952	Deleção	1	15,4	28	GTF2E1
351	21	5	q35.3	180378874	180430789	Deleção	1	51,9	34	BTNL3
352	21	7	q34	142820842	142891708	Deleção	1	70,9	83	PIP, TAS2R39
353	21	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
354	21	9	q21.12	73423869	73446819	Deleção	1	23,0	28	TRPM3, MIR204
355	21	9	q32	115392790	115591155	Duplicação	3	198,4	187	KIAA1958, C9orf80, SNX30
356	21	14	q11.2	22390504	22408688	Deleção	1	18,2	27	-
357	21	14	q23.3	67111441	67148873	Duplicação	3	37,4	62	GPHN
358	21	14	q32.33	106328973	106728149	Duplicação	4	399,2	74	KIAA0125, ADAM6

359	21	16	q12.2	55796375	55816692	Deleção	1	20,3	28	CES1P1
360	21	20	q13.2	52652344	52658060	Deleção	1	5,7	26	BCAS1
361	21	22	q12.3	34188089	34227501	Deleção	1	39,4	160	LARGE
362	21	X	p22.31	8189571	8189966	Deleção	1	0,4	26	-
363	21	X	q21.31	89752139	89878515	Deleção	1	126,4	44	-
364	21	X	q21.33	94374390	94469750	Deleção	1	95,4	57	-
365	21	X	q26.3	134928992	134966528	Duplicação	4	37,5	104	CT45A4, CT45A5, CT45A6
366	21	X	q26.3	136495210	136495793	Deleção	1	0,6	25	-
367	21	X	q28	147317018	147325589	Deleção	1	8,6	44	-
368	22	3	p21.31	46793363	46872554	Deleção	1	79,2	55	PRSS42
369	22	3	q21.2	125712256	125721849	Deleção	1	9,6	31	-
370	22	4	q13.2	69435888	69551731	Deleção	1	115,8	60	UGT2B15
371	22	4	q24	104199891	104250294	Deleção	1	50,4	32	-
372	22	5	q35.3	180378753	180430789	Deleção	1	52,0	36	BTNL3
373	22	7	p22.3	154720	158615	Deleção	1	3,9	28	-
374	22	8	p11.22	39247097	39386952	Deleção	1	139,9	76	ADAM5P, ADAM3A
375	22	10	q26.3	135357401	135427143	Duplicação	3	69,7	81	SYCE1, SPRNP1
376	22	11	q11	55374018	55442305	Deleção	1	68,3	80	OR4P4, OR4S2, OR4C6
377	22	14	q32.33	106329183	106896439	Duplicação	3	567,3	128	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
378	22	18	q12.2	36426123	36494542	Deleção	1	68,4	56	-

379	22	21	q21.2	24379491	24450835	Deleção	1	71,3	52	-
380	22	X	p21.3	29160657	29174711	Deleção	0	14,1	54	IL1RAPL1
381	22	X	q23	115576235	115588807	Deleção	1	12,6	50	SLC6A14
382	22	X	q26.2	130649648	130980665	Duplicação	3	331,0	248	OR13H1, LOC286467
383	22	X	q28	147317018	147325589	Deleção	1	8,6	44	-
384	22	X	q28	148884728	148958011	Duplicação	3	73,3	88	-
385	23	1	p12	120104042	120140010	Deleção	1	36,0	36	HSD3BP4
386	23	1	q21.1	144086896	144567360	Duplicação	3	480,5	65	SRGAP2P2, LOC728855, LOC728875, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4A
387	23	1	q44	248753332	248795277	Deleção	1	41,9	56	OR2T10, OR2T11
388	23	3	p21.1	53031722	53038931	Deleção	1	7,2	36	SFMBT1
389	23	3	q21.2	125708696	125721738	Deleção	1	13,0	32	-
390	23	3	q28	189360742	189371964	Deleção	1	11,2	35	TP63
391	23	5	q12.1	61420500	61471447	Deleção	1	50,9	36	-
392	23	5	q35.3	180378753	180418090	Deleção	1	39,3	34	BTNL3
393	23	9	p24.1	6714317	6795052	Duplicação	3	80,7	64	KDM4C
394	23	11	q11	54965374	55039246	Deleção	1	73,9	56	TRIM48
395	23	12	p13.2	11217136	11251861	Deleção	1	34,7	39	PRR4, PRH1, TAS2R43
396	23	12	q23.1	99791778	99798721	Deleção	1	6,9	32	ANKS1B
397	23	14	q32.33	106246288	106519050	Duplicação	3	272,8	138	KIAA0125, ADAM6

398	23	19	q13.2	41352688	41392187	Deleção	1	39,5	47	CYP2A6, CYP2A7
399	23	22	q13.31	46695304	46706364	Deleção	1	11,1	28	GTSE1
400	23	X	p22.31	6621974	6634382	Duplicação	3	12,4	65	-
401	23	X	p21.3	29111923	29117749	Deleção	0	5,8	37	IL1RAPL1
402	23	X	p11.23	47865294	48001375	Duplicação	3	136,1	100	SPACA5, SPACA5B, ZNF630, SSX6
403	23	X	q26.1	129375388	129383116	Deleção	1	7,7	29	ZNF280C
404	23	X	q26.3	134947463	134962480	Deleção	1	15,0	30	CT45A5
405	23	X	q26.3	136943142	136952177	Duplicação	3	90,4	88	-
406	23	X	q28	154918771	154952242	Deleção	1	33,5	36	