

Isabela Mayá Wayhs Silva

InDels e CNVs pequenas em pacientes com Transtorno do
Espectro Autista

InDels and small CNVs in patients with Autism Spectrum
Disorder

São Paulo

2017

RESUMO

SILVA, I. M. W. **InDels e CNVs pequenas em pacientes com Transtorno do Espectro Autista**. 2017. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma doença do neurodesenvolvimento. É caracterizado por déficits significativos e persistentes na comunicação e na interação social e por padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades. O TEA é considerado uma doença comum, afetando 1 a cada 68 crianças e com uma proporção de 4,2 meninos afetados para cada menina. A etiologia do autismo apresenta um forte componente genético. Neste contexto, as metodologias genômicas de larga escala (Sequenciamento de nova geração, microarray) contribuíram para o conhecimento sobre a genética do TEA. No entanto, em aproximadamente 70% dos pacientes, o transtorno permanece com etiologia não identificada. Com base nisso, para o presente trabalho, elaborou-se a hipótese de que pequenas CNVs (entre 1 e 50 Kb), que se encontram abaixo da resolução da maioria dos microarrays comerciais, e cuja detecção ainda apresenta limitações para a sua detecção através de sequenciamento de nova geração, poderiam contribuir para o fenótipo em uma proporção significativa dos casos. Como primeira etapa para abordar essa questão, realizou-se a metodologia de aCGH customizado 60K cobrindo um total de 269 genes candidatos ao TEA, a fim de selecionar CNVs potencialmente patogênicas entre 98 pacientes brasileiros com TEA idiopático. Com esta triagem inicial, a prevalência de CNVs potencialmente patogênicas obtida foi de 9%, com 20% delas caracterizadas como pequenas. A análise subsequente foi realizada com a metodologia de aCGH customizado 180K, o qual cobriu um total de 1527 genes candidatos ao TEA. Um total de 63 pacientes com autismo foram analisados com este novo array. A partir destas hibridações, a prevalência de CNVs potencialmente patogênicas obtida foi de 12,7%, com 62,5 % delas classificadas como pequenas. Esta taxa de detecção é bastante expressiva, particularmente se considerarmos que a amostra de pacientes utilizada foi submetida a uma pré-triagem, com a finalidade de excluir os pacientes com as CNVs mais prevalentes no TEA, nas regiões 15q11-q13,

16p11.2 e 22q13.3. A última abordagem utilizada neste trabalho foi comparar a detecção de CNVs pela metodologia de aCGH, referência padrão ouro para detecção de CNVs, com a de sequenciamento de nova geração (NGS). Os dados de 9 pacientes obtidos por NGS foram analisados através dos softwares NextGene e XHMM. Os softwares, no entanto, apresentaram resultados discrepantes entre si e pouca sobreposição com os dados de aCGH 180K, de 38,9% e 50%, considerando o NextGene e o XHMM respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o aCGH customizado é promissor para a detecção de CNVs pequenas e que essas, por sua vez, podem contribuir para o risco de TEA em pelo menos 6,3 %, dos casos.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista, variação no número de cópias, array-CGH, sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

SILVA, I. M. W. **InDels and small CNVs in patients with Autism Spectrum Disorder**. 2017. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder. It is characterized by significant and persistent deficits in communication and social interaction, and by restricted and repetitive patterns of behavior, interests or activities. ASD is considered a common disease, affecting 1 in 68 children and a proportion of 4.2 boys affected for each girl. The etiology of autism has a strong genetic component. In this context, genomic methodologies of high-throughput (new generation sequencing, microarray) contributed to the knowledge about the genetics of ASD. However, in approximately 70% of patients with ASD, the disorder remains with unidentified etiology. Therefore, for this work, it was hypothesized that small CNVs (between 1 and 50 Kb), which are below the resolution of most commercial microarrays and whose detection still has limitations for its detection through NGS, could contribute to the phenotype in a proportion of cases. As a first step to address this hypothesis, it was performed the methodology of custom aCGH 60K, covering a total of 269 ASD candidate genes, in order to select potentially pathogenic CNVs among 98 Brazilian patients with idiopathic ASD. With this initial screening, the prevalence of potentially pathogenic CNVs obtained was 9%, with 20% of them characterized as small. The subsequent analysis was performed using the 180K custom aCGH methodology, which covered a total of 1527 TEA candidate genes. A total of 63 patients with autism were analyzed with this new array. From these hybridizations, the prevalence of potentially pathogenic CNVs obtained was 12.7%, with 62.5% of them classified as small. This detection rate is quite significant, particularly considering that the sample of patients used was pre-screened, in order to exclude patients with the most prevalent CNVs in ASD in the regions 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13.3. The last approach used in this work was to compare the detection of CNVs by the methodology of aCGH, gold standard reference for CNVs detection, with the next generation sequencing (NGS). Data from 9 patients obtained by NGS were analyzed using NextGene

and XHMM software. The softwares, however, presented discrepant results among themselves and little overlap with the data of aCGH 180K, of 38.9% and 50%, considering NextGene and XHMM respectively. These results suggest that the customized aCGH represents a promising approach for the detection of small CNVs and that these, in turn, can contribute to the risk of ASD in at least 6,3 % of cases.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, copy number variation, array-CGH, next generation sequencing.

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma doença clinicamente heterogênea, caracterizada por déficits significativos e persistentes na comunicação/interação social e por padrões repetitivos e restritos de comportamento, interesses ou atividades.

Estima-se que 1 a cada 68 crianças apresente o Transtorno do Espectro Autista, de acordo com prevalência estimada nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2014), o que caracteriza o TEA como uma doença comum.

Devido à alta herdabilidade estimada para o TEA, de aproximadamente 50%, o foco principal de trabalhos envolvendo a etiologia deste transtorno tem sido as causas genéticas (GAUGLER *et al.*, 2014; CHASTE e LEBOYER, 2012).

A arquitetura genética do autismo é complexa, na qual diversas formas de variação genética, diferindo em frequência, modelos de herança, tipo de variação e modelos de ação, contribuem para a sua etiologia (DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

Os fatores genéticos associados ao TEA correspondem a, aproximadamente, 35 % dos casos de autismo, número este inferior aos valores mais recentes estimados de herdabilidade, que é de aproximadamente 50% (GAUGLER *et al.*, 2014; SANDIN *et al.*, 2014).

Acredita-se que o efeito da interação gene-ambiente (ainda pouco compreendido quando se trata do TEA), as variações em regiões não codificantes, a contribuição das variantes comuns, a contribuição das variações no número de cópias (CNVs) pequenas e de pequenas inserções e deleções (InDels) ainda subcaracterizadas devido às limitações das tecnologias atuais (MANOLIO *et al.*, 2009; MANOLIO, 2010), possam estar correlacionadas a uma parte dos casos de TEA, classificados como casos idiopáticos, ou de etiologia desconhecida.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo detectar CNVs (duplicações e deleções maiores que 1 Kb), principalmente as pequenas,

menores que 50 Kb, potencialmente patogênicas e InDels (pequenas inserções e deleções menores que 1Kb) potencialmente patogênicas em pacientes com TEA idiopático.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar a importância de pequenas CNVs/InDels raras na etiologia do Transtorno do Espectro Autista.

1.1.2 Específicos

- Validar as lâminas customizadas de aCGH 60K e 180K, através de outras metodologias como qPCR e outras plataformas comerciais de array.
- Caso o array customizado seja validado, realizar a análise de um número amostral maior de pacientes, a fim de caracterizar e avaliar a frequência de alterações potencialmente patogênicas grandes e pequenas na amostra.
- Verificar a possibilidade de se utilizar dados de sequenciamento de última geração (NGS) para a detecção de CNVs.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) foi descrito pela primeira vez por Kanner, um psiquiatra austríaco, em 1943, após a observação de onze crianças, do sexo masculino em sua maioria, cujo quadro clínico era distinto de retardo mental por apresentarem isolamento social. No caso, os pacientes observados foram caracterizados como apresentando distúrbio autístico de contato afetivo.

Logo após essa observação, outros casos similares no que se refere ao isolamento social foram diagnosticados até se chegar a uma definição mais concreta das características que definem um indivíduo como afetado pelo Transtorno do Espectro Autista (FOLSTEIN, 2006).

Na última edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), publicada em maio de 2013, definiu-se que o TEA é uma doença neuropsiquiátrica caracterizada por déficits significativos e persistentes na comunicação/interação social e por padrões repetitivos e restritos de comportamento, interesses ou atividades.

Os primeiros sintomas do TEA surgem durante o período inicial do desenvolvimento, porém são geralmente diagnosticáveis a partir dos 18 meses (MATSON e KOZLOWSKI, 2011). De acordo com o Manual DSM-V (2013), para que seja diagnosticado o paciente deve apresentar:

- a) Três alterações na comunicação/interação social:
 1. Falta de reciprocidade social;
 2. Problemas com a comunicação não verbal;
 3. Déficit no desenvolvimento, manutenção e compreensão das relações interpessoais;
- b) Pelo menos duas manifestações de padrões repetitivos e restritos de comportamento, interesses ou atividades entre as quatro seguintes:

1. Movimentos motores, uso de objetos e fala repetitivos e estereotipados;
2. Aderência excessiva a rotinas e padrões comportamentais ritualizados;
3. Interesses fixos e restritos;
4. Hipo ou hiper-reatividade a estímulos sensoriais;

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (2013), eliminou as subcategorias Transtorno Autista, Síndrome de Asperger e Transtorno Global do Desenvolvimento Não Especificado, presente nas edições anteriores, e difíceis de serem distinguidas devido à sobreposição clínica existente entre elas. Adotou-se apenas um termo, mais amplo, denominado Transtorno do Espectro Autista, que é classificado em três níveis de gravidade baseado no nível de prejuízo na comunicação/ interação social e nos padrões comportamentais.

O nível 1, ou autismo de alto funcionamento, classifica um indivíduo que apresenta um QI na faixa normal ou superior, porém com habilidades sociais e linguagem inadequada, enquanto o 3, ou autismo de baixo funcionamento, mais grave, caracteriza um paciente muitas vezes não verbal com um grave prejuízo cognitivo (DSM-V; MUHLE *et al.*, 2013).

O TEA é clinicamente heterogêneo, ou seja, além dos sintomas típicos, outras comorbidades também podem estar presentes. Assim, 30% a 50% dos pacientes apresentam também Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade e/ou ansiedade, 40% a 60% possuem déficit intelectual e 25% a 40% manifestam outras comorbidades como epilepsia, obesidade, problemas gastrointestinais, dismorfias e alergias (FOMBONNE, 1999; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000; TUCHMAN *et al.*, 2002; LEYFER *et al.*, 2006; MATSON *et al.*, 2011; DEVLIN e SCHERER, 2012).

Antes considerado raro, o TEA tem sido identificado em um número cada vez maior de indivíduos. Fombonne (1999), compilando vinte e três estudos publicados entre 1989 e 1998, conduzidos em doze países e somando um total

de 4 milhões de indivíduos com idade média de 8,5 anos, obtiveram uma prevalência do TEA de 7.2/10.000. Dez anos depois, novamente Fombonne (2009), com base em outra compilação, desta vez contemplando 43 estudos publicados entre 1966 e 2008, em dezessete países diferentes, encontraram prevalência de TEA na magnitude de 63,7/10.000.

Entre as estimativas mais recentes de prevalência está a do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2014), com um valor de 147/10.000, estimado a partir de levantamento realizado em onze comunidades diferentes dos Estados Unidos. Este último dado torna o TEA uma doença comum, tendo sido, inclusive, caracterizado como questão emergente de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (PANG *et al.*, 2012).

Por outro lado, a crescente evidência dos casos de TEA não vem acompanhada de unanimidade, há controvérsias que apontam este fato como decorrente, entre outros aspectos, das mudanças no critério de diagnóstico, das novas políticas para educação especial, do aumento da disponibilidade de serviços nessa área e da diminuição da idade de diagnóstico. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de ter ocorrido um aumento real na sua incidência (FOMBONNE *et al.*, 1999; FOMBONNE *et al.*, 2009, MATSON e KOZLOWSKI, 2011).

A prevalência do TEA no Brasil foi estimada em 27.2/10.000, em um estudo conduzido em Atibaia, em 2011, com um grupo amostral de 1470 crianças. Este valor está abaixo do que é encontrado para a população mundial, o que pode estar associado a fatores como: (a) pequena amostra local e (b) pouca conscientização da população e dos profissionais de saúde (PAULA *et al.*, 2011).

O TEA é uma doença que atinge, no geral, 4,2 vezes mais homens do que mulheres, diferença esta que pode subir para 7:1 quando se leva em consideração apenas os quadros de autismo de alto funcionamento (DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

2.2 CONTRIBUIÇÃO DOS FATORES GENÉTICOS PARA A ETIOLOGIA DO TEA

Não há consenso sobre a contribuição relativa dos fatores ambientais, genéticos e epigenéticos para o risco de TEA. A influência dos fatores ambientais, como exposição a teratógenos, complicações perinatais e infecções pré-natais, é difícil de ser mensurada. Neste contexto de dificuldades, os fatores ambientais podem explicar alguns casos do transtorno, associados ou não aos fatores genéticos (MUHLE *et al.*, 2004), que estão em conformidade com indicações de estudos epidemiológicos quanto a sua importância (NEWSCHAFFER *et al.*, 2012; KIM e LEVENTHAL, 2015).

Aspectos como alta taxa de concordância encontrada para o TEA entre gêmeos monozigóticos, que varia, geralmente, entre 60 e 90% enquanto que para os dizigóticos não ultrapassa 30% (BAILEY *et al.*, 1995; FOLSTEIN e ROSEN-SHEIDLEY, 2001; BOURGERON, 2015), aumento de características subclínicas como dificuldades na comunicação e socialização, preferência por rotinas e dificuldade de lidar com mudanças, detectadas em parentes de primeiro grau de pacientes com TEA, bem como o risco aumentado de outros casos de TEA na família após um probando, reforçam a importância dos fatores genéticos para a etiologia do autismo (HOLLANDER *et al.*, 2012; DEVLIN e SCHERER, 2012; FOLSTEIN e ROSEN-SHEIDLEY, 2001).

Estudos recentes, que extrapolam o modelo de pesquisa com gêmeos, estimam que os fatores genéticos estão associados a aproximadamente 50% dos casos de TEA. Um deles, elaborado por Gaugler *et al.* (2014), considerou variações genéticas raras e comuns para a estimativa da herdabilidade, mostrando um valor de herdabilidade de 52,4%. Outro, elaborado por Sandin *et al.* (2014), utilizando informações sobre diagnósticos de TEA em gêmeos monozigóticos e dizigóticos, irmãos completos e meio irmãos, considerou a contribuição para o TEA de fatores genéticos e ambientais, mostrando uma herdabilidade de 50%.

2.2.1 Variantes Comuns e o TEA

A abordagem doença comum/variante comum, que pressupõe que variantes genéticas mais amplamente distribuídas na população (polimórficas) estão associadas a um aumento no risco para as doenças de prevalência alta, também trouxe avanços no entendimento da genética do TEA. A partir dela iniciaram-se estudos de ligação e de associação (GWAS), os quais, apesar de promissores, apresentaram resultados de baixa replicabilidade e limitações quanto à identificação de regiões/alelos que contribuíssem para o TEA (MOLLOY *et al.*, 2005; SZATMARI *et al.*, 2007; ARKING *et al.*, 2008; ALÁRCON *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; GAI *et al.*, 2012; DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

Devlin e Scherer (2012), com o objetivo de verificar a força de associação entre um suposto alelo de risco e o autismo, estimaram o *odds ratio* de variantes comuns individuais encontradas em alguns estudos de GWAS. Estes autores (*Ibidem*), obtiveram valor de *odds ratio* de 1.2 aproximadamente, o que indica que um indivíduo que carrega umas dessas variantes apresenta um risco 1.2 maior de desenvolver autismo do que um outro que não carrega esta variante.

Em base a esse contexto de conhecimentos se conclui que variantes comuns apresentam individualmente um efeito muito moderado para o risco de TEA, podendo apresentar, por outro lado, um efeito aditivo e contribuir de forma significativa para a susceptibilidade ao autismo em conjunto com as variações raras (BOURGERON, 2015).

2.2.2 Variantes Raras e o TEA

A relação entre as variantes raras e o TEA foi inicialmente verificada através do cariótipo com bandeamento G, a partir do qual verificou-se alterações estruturais microscópicas raras associadas a diversas síndromes, entre as quais algumas com sobreposição clínica com o TEA (EL FISHAWY e STATE, 2010; BOURGERON, 2016).

Alterações estruturais microscópicas são ganhos ou perdas de material genético, inversões, translocações, passíveis de serem vistas através da resolução de >3Mb que o cariótipo apresenta. Estas alterações estão presentes

em até 7,4% dos casos de TEA (EL FISHAWY e STATE, 2010; DEVELIN e SCHERER, 2012).

Entre as síndromes genéticas mais comuns com sobreposição ao TEA, estão: esclerose tuberosa (correspondente a cerca de 1 % dos casos de TEA), síndrome do X-frágil (1-2% dos casos), neurofibromatose (<1% dos casos), Síndrome de Rett (0.5%), entre outras (KUSENDA *et al.*, 2008; MILES *et al.*, 2010; DEVLIN e SCHERER, 2012).

A contribuição de variantes raras para a etiologia do TEA tem seguido duas linhas principais de investigação: análise de variações de nucleotídeo único (SNVs) e de pequenas inserções e deleções (InDels) e análise de variações no número de cópias (CNVs) em todo o genoma ou exoma (SBACCHI *et al.*, 2010; IOSSIFOV *et al.*, 2012; NEALE *et al.*, 2012; O'ROAK *et al.*, 2012; SANDERS *et al.*, 2012).

A análise de variações de nucleotídeo único - SNVs (troca de um único nucleotídeo na sequência de DNA) e de pequenas inserções e deleções - InDels (inserções ou deleções com tamanho inferior a 1Kb), tem sido realizada principalmente com a metodologia de sequenciamento de nova geração-NGS, de início apenas com sequenciamento de exoma (IOSSIFOV *et al.*, 2012; NEALE *et al.*, 2012; O'ROAK *et al.*, 2012; SANDERS *et al.*, 2012; IOSSIFOV *et al.*, 2014) e mais recentemente também com o de genoma (YUEN *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2016).

As informações existentes atualmente sobre SNVs e InDels (<10pb) raras de perda de função e *de novo*, indicam que estas alterações contribuem para cerca de 7-13,8 % dos casos *simplex* de autismo (DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

Estudos sobre o impacto de SNVs/InDels de perda de função raras e herdadas para o risco de TEA são recentes, no entanto, estas alterações podem significar uma importante influência quando agem de forma dominante, podendo ou não serem penetrantes e/ou com expressividade variável, ou recessiva. Suspeita-se que variantes herdadas raras, assim como variantes comuns,

também atuam de forma aditiva para o risco de TEA (DE RUBEIS e BUXBAUM, 2014; DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

A disponibilidade de metodologias de *high-throughput* (*microarray*, *NGS*), com resolução superior à que se encontra, por exemplo, com o cariótipo de banda G, permitiu a identificação de variações no número de cópias - CNVs (duplicações ou deleções maiores que 1Kb) associadas ao TEA. As CNVs raras (>100 Kb), *de novo* e algumas herdadas, estão associadas a aproximadamente 10 % dos casos *simplex* de autismo (SEBAT *et al.*, 2007; MARSHALL *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2010; BETANCUR *et al.*, 2011, LI *et al.*, 2012; DEVLIN e SCHERER, 2012).

As alterações SNVs, InDels, CNVs, classificadas em comuns e raras, herdadas e *de novo*, trouxeram contribuições para a identificação de genes associados ao TEA, conforme mostrado no site do *Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI)*. Na última atualização do *SFARI*, feita em setembro de 2016, a lista de genes associados ao TEA exibiu 845 genes. Paradoxalmente, de uma maneira geral, nenhum desses genes contribuiu para mais do que 1% dos casos de TEA (BOURGERON, 2015).

A distribuição funcional dos genes associados ao TEA engloba principalmente as funções moleculares de desenvolvimento neuronal e orientação axonal, sinalização de MAPK e outras sinalizações, modificação da cromatina e regulação da transcrição, tradução e degradação de proteínas e a neurotransmissão (SBACCHI *et al.*, 2009; GLESSNER *et al.*, 2009; SWANWICK *et al.*, 2011).

Esses aspectos, apesar de largamente difundidos entre as funções neurobiológicas, contribuem de maneira conjunta com a excitabilidade neuronal, acarretando em um mesmo fenótipo (GESCHWIND *et al.*, 2008; SBACCHI *et al.*, 2010; SWANWICK *et al.*, 2011).

2.3 VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS E O TEA

CNVs são os tipos mais frequentes de variações genômicas estruturais, constituídas por duplicações ou deleções submicroscópicas de segmentos de DNA maiores que 1 Kb, podendo ser *de novo* ou herdadas (MERIKANGAS *et al.*,

2009; SBACCHI *et al.*, 2010). Estas alterações tendem a ocorrer com maior frequência em sequências de DNA que contêm ou são flanqueadas por regiões com baixo número de cópias (*low copy repeats* – LCR - fragmentos repetitivos de DNA com extensão entre 1 Kb a 400 Kb, que compartilham mais de 90 % de identidade), e que causam instabilidade genômica, podendo mediar ou estimular a formação de CNVs (FREEMAN *et al.*, 2006; STANKIEWICZ *et al.*, 2010).

As CNVs podem ocorrer durante a meiose nas células germinativas, ou em células somáticas, levando ao mosaicismo¹. Originam-se a partir de diferentes mecanismos, como: recombinação homóloga não alélica (*Nonallelic Homologous Recombination* – NAHR), junção de extremidades não homólogas (*Non-homologous End Joining* – NHEJ), erros na replicação do DNA (*Fork Stalling and Template Switching* – FoSTeS) e através de retrotransposição (SMITH *et al.*, 2008; STANKIEWICZ e LUPSKI, 2010).

Pode haver uma correlação entre o tamanho da CNV e o mecanismo de sua origem. CNVs grandes são, com uma maior frequência, associadas a NAHR, enquanto as CNVs pequenas tendem a estar associadas a NHEJ ou FoSTes (FREEMAN *et al.*, 2006).

As CNVs podem afetar o fenótipo de diferentes maneiras tais como: efeitos de dosagem, devido à perda ou ganho de um gene inteiro, rompimento de sequências codificantes de um dado gene, alteração de regiões regulatórias. O efeito final pode tanto ser alteração da expressão de um ou mais genes quanto à formação de proteínas variantes. No caso das deleções, pode ocorrer a expressão de mutação recessiva em loco(s) correspondente no cromossomo homólogo (SMITH *et al.*, 2008; SWANWIK *et al.*, 2011).

Uma das grandes dificuldades encontradas quando se estuda a relação CNVs *versus* doença, é a averiguação da patogenicidade das CNVs, já que 12% a 15% do genoma humano apresenta variações no número de cópias, o que explica, em grande parte, a variação fenotípica normal encontrada na população (SENER, 2014).

¹ Coexistência de células geneticamente diferentes provenientes de um mesmo zigoto

As CNVs *de novo*, no geral, apresentam uma maior probabilidade de patogenicidade, já que são submetidas a uma menor pressão seletiva. No entanto, tendo em mente mecanismos como penetrância incompleta e expressividade variável, recorrentes no TEA, além do fator efeito aditivo, tem se discutido mais sobre a patogenicidade de alterações herdadas para o TEA (SWANWICK e LARSEN, 2011; DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

A fim de verificar a patogenicidade das CNVs, é necessário levar em conta a diferença genética entre grupos étnicos, a frequência com que a variação aparece nos indivíduos saudáveis e nos afetados, a localização da alteração, a função dos genes envolvidos na alteração e saber que muitas vezes elas podem estar associadas à penetrância incompleta e/ou expressividade variável no TEA (SWANWICK e LARSEN, 2011).

2.3.1 Caracterização de CNVs em Pacientes com TEA

Algumas regiões genômicas, com variação do número de cópias (CNVRs), flanqueadas, em sua maioria, por regiões LCR, são alvos mais frequentes de diferentes CNVs em pacientes com TEA. As CNVRs para o TEA correspondem às regiões: 1q21.1, 2p16.3, 3p26.3, 6q26, 7q11.22, 15q11-q13, 15q13.3, 16p11.2, 22q11.21 e 22q13.33.

Entre essas CNVRs, as que apresentam maior frequência entre os casos de TEA de diferentes populações, correspondendo a 1-3% e reconhecidas como *hotspot*, são aquelas localizadas no 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13.3. No contexto de *hotspot*, foi identificada no Brasil uma prevalência de CNVs de 2,7% (KUSENDA *et al.*, 2008; SWANWICK *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2014).

No total, 2163 CNVs loci diferentes já foram descritos como associadas ao TEA no SFARI, de 2016.

Pinto *et al.* (2014) identificaram 84 CNVs patogênicas, em conformidade com indicações do *American College of Medical Genetics*, em 82 (3,3%) de 2446 pacientes com TEA. Desses 82 pacientes, 83% foram classificados como TEA não síndrômico.

Estes autores (*Ibidem*) caracterizaram as 84 CNVs patogênicas como sendo 54 delas (64%) *de novo* (59% deleção e 41% duplicação) e 30 (36%) herdadas. Dentre as alterações herdadas, 20 são de origem materna e 10 de origem paterna.

Estas alterações patogênicas se distribuíram entre os tamanhos <30Kb até >10Mb. As deleções, em média, estão em maior proporção entre as alterações até 5Mb, enquanto na faixa de tamanho de maiores que 5Mb a maior proporção é de duplicações patogênicas. O tamanho médio das CNVs de novo foi maior do que as herdadas, de 3,1 Mb e 1,4 Mb respectivamente. As CNVs menores que 30Kb representaram a menor porcentagem de CNVs patogênicas, inferior a 10%, o que se deve, provavelmente, a limitação, neste sentido, da metodologia utilizada, Illumina 1 M array (PINTO *et al.*, 2014).

Entre os estudos que caracterizaram alterações pequenas, o do Krumm *et al.* (2013), através de sequenciamento de exoma, mostra uma frequência de cerca de 13% a mais de CNVs herdadas pequenas e raras (<50 Kb) em probandos quando comparados aos seus irmãos, sendo essas alterações transmitidas preferencialmente pela mãe. Extrapolando os dados de literatura existentes a respeito de CNVs, evidencia-se que as alterações pequenas (<20 Kb) sejam muito mais frequentes que as grandes (REDON *et al.*, 2006).

Um aumento significativo de pequenas deleções raras (<30 Kb) também foi observado, através de sequenciamento de exoma, em uma amostra de pacientes com TEA quando comparada a um grupo controle, 28% versus 21%, respectivamente (POULTNEY *et al.*, 2013). Esses dados fortalecem a ideia de que as pequenas CNVs correspondem a um importante fator de risco ao TEA.

As mulheres com TEA, em geral, apresentam ou CNVs patogênicas maiores ou uma maior quantidade de mutação do que os homens afetados, caracterizando o modelo de efeito de proteção feminina, que sugere que as mulheres precisam de uma carga etiológica maior para manifestar o fenótipo de TEA. Este é um dos fatores que se acredita contribuir para a diferença de prevalência do TEA em homens *versus* mulheres (JACQUEMONT *et al.*, 2014; DE RUBEIS e BUXBAUM, 2015).

2.3.2 Detecção de CNVs

A detecção das CNVs pode ser feita por meio do uso de diversas técnicas, entre elas a hibridização genômica comparativa por microarranjo (aCGH), microarranjo de polimorfismos de base única (SNP-array), sequenciamento de última geração.

Atualmente a metodologia que é considerada *gold-standard* para a detecção dessas alterações é o aCGH. No entanto, visto que a metodologia de NGS apresenta uma maior cobertura e resolução do genoma, e pode possibilitar a integração tanto de informações de mutações de base única como de CNV, espera-se que em breve essa seja a tecnologia que venha substituir o aCGH.

O aCGH, apesar de vantajoso em termos de custo e análise dos dados gerados, apresenta algumas limitações que incluem ruído de hibridização, dificuldades na detecção de pontos de interrupção, pouca cobertura do genoma.

A tecnologia de NGS, por sua vez, ainda apresenta desafios computacionais para a detecção de CNVs que precisam ser superados – associado ao conteúdo de GC (guanina-citosina), a regiões repetitivas do genoma, ao tamanho reduzido das *reads*, a outras regiões que também amplificam menos na etapa de PCR como regiões reguladoras - estes fatores dificultam a normalização e posteriormente o cálculo estatístico para a chamada de CNVs (ZHAO *et al.*, 2013; ALKAN *et al.*, 2011; MEI TEO *et al.*, 2012).

Neste contexto, a solução imediata mais eficaz para ultrapassar as limitações de cada tecnologia é a integração das diferentes técnicas tais como aCGH e NGS, e a combinação de diferentes softwares para a análise dos dados de sequenciamento, principalmente quando se trata de detecção de CNVs pequenas e InDels, que representam um desafio ainda maior (ZHAO *et al.*, 2013; ALKAN *et al.*, 2011).

Em 2015 foi lançado pela *Agilent Technologies*® um novo *kit* para sequenciamento, o *OneSeq Target Enrichment*, que foi projetado para detectar e analisar variações de número de cópias, perda de heterozigidade e variantes de base única em uma única reação. Este *kit* se caracteriza pelo enriquecimento de regiões exônicas de interesse associado a *targets*. Essa conformação do kit permite a detecção de CNVs grandes (>300Kb) que tenham pontos de quebra em regiões intrônicas.

A expectativa é que com o contínuo aperfeiçoamento dessas técnicas seja possível detectar CNVs cada vez menores e InDels (Inserções ou deleções menores que 1 Kb), que por sua vez, permitem a identificação de novos genes de risco de forma mais fácil e direta já que essas alterações incluem, geralmente, um menor número de genes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

1. As customizações de aCGH realizadas não foram eficazes para a detecção de InDels grandes (70 pb – 1kb). Portanto estas alterações permanecem subcaracterizadas quando se trata de TEA.
2. O aCGH customizado mostrou-se uma estratégia promissora para elucidar mecanismos etiológicos do TEA idiopático associado a CNVs, visto que se obteve uma prevalência relativa de CNVs maior do que a descrita na literatura com ambas as customizações, podendo se tornar uma possível ferramenta de diagnóstico.
3. A análise dos dados de *NGS* através dos softwares *NextGene* e *XHMM* não é eficaz para a delimitação dos pontos de quebra de alterações detectadas pelo aCGH e não permite a migração de tecnologia, do aCGH para o *NGS* (considerando apenas análises feitas através do *NextGene* e *XHMM*).
4. As CNVs pequenas contribuem para o risco de TEA em pelo menos 6,3 %, reforçando a sua importância para a etiologia do TEA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAAH-MENSAH, G.K. e TAYLOR, R.C. Brain in situ hybridization maps as a source for reverse-engineering transcriptional regulatory networks: Alzheimer's disease insights. **Gene**, 586(1):77-86, 2016.

ALARCÓN, M. *et al.* Linkage, Association, and Gene-Expression Analyses Identify CNTNAP2 as an Autism-Susceptibility Gene. **Am J Hum Genet**, 82(1):150-9, 2008.

ALKAN, C.; BRADLEY, P.C. e EICHLER, E.E. Genome structural variation discovery and genotyping, **Nature Reviews/Genetics**, 12:363-375, 2011.

KEARNEY, HM., *et al.*, American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants, **Genet Med.**, 13(7):680-5., 2011

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV. 4th ed. Washington (DC): **American Psychiatric Association**, 943 p., 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-V. 5th ed. Washington (DC): **American Psychiatric Association**, 943 p., 2013.

ANNEY, R. *et al.* A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. **Human Molecular Genetics**, 1-11.2010.

ARKING, D.E. A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism, **Am J Hum Genet**, 82:160-164, 2008.

ASADOLLAHI, R. *et al.* The clinical significance of small copy number variants in neurodevelopmental disorders. **J Med Genet**, 51:677-688, 2014.

AZEVEDO JA., *et al.* The microRNA Network Is Altered in Anterior Cingulate Cortex of Patients With Unipolar and Bipolar Depression. *J Psychiatr Res*, 82, 58-67, 2016.

BAILEY, A. *et al.* Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. **Psychol Med**, 25(1):63-77, 1995.

BARLETT, C.W.; GOEDKEN, R. e VIELAND, J. Effects of auditing linkage evidence across subsets of data: reanalysis of the autism genetic resource exchange data set. **Am J Hum Genet**, 76:688-695, 2005.

BASU, S. N.; KOLLU, R. e BANERJEE-BASU, S. AutDB: a gene reference resource for autism research. **Nucleic Acids Research**, 37(Databaseissue), 832-836, 2009.

BERRY, C.T. *et al.* Developmental upregulation of vesicular glutamate transporter-1 promotes neocortical presynaptic terminal development. **PLoSOne**, 7, e50911, 2012.

BETANCUR, C. Etiological Heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, 1380:42-77. 2011.

BOURGERON, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. **Nat Rev Neurosci**. 16(9):551-63, 2015.

BOURGERON, T. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. **C R Biol**, 339(7-8):300-7, 2016.

BUCAN, M. *et al.* Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. **PLoS Genet**. Jun;5(6):e1000536, 2009.

BRITO, L.A. *et al.* Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. **Am. J. Med. Genet Part A**, v. 155A, 7, 1581-7, 2011.

CANLI, T. Neurogenethics: An emerging discipline at the intersection of ethics, neuroscience, and genomics. **Appl Transl Genom.** 5:18-22, 2015.

CARREIRA, I. M. *et al.* Copy-number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. **Molecular Cytogenetics**, 8:13, 2015.

CELESTINO-SOPER, P. B. *et al.* Use of array CGH to detect exonic copy number variants throughout the genome in autism families detects a novel deletion in TMLHE. **Human Molecular Genetics**, 20:4360-4370, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. **MMWR Surveillance Summaries**, 63:1-21, 2014.

CHASTE, P. e LEBOYER, M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. **Dialogues Clin Neurosci.** (3), 281-92, 2012.

CHEN Q. *et al.* SREB2/GPR85, a schizophrenia risk factor, negatively regulates hippocampal adult neurogenesis and neurogenesis-dependent learning and memory. **Eur J Neurosci**, 36(5): 2597–2608, 2012.

CHEN, L. *et al.* Genome Architecture and its roles in human copy number variation. **Genomics Inform**, 12(4):136-144, 2014.

CHIOCCHETTI, A.G.; BOUR, H.S. e FREITAG, C.M. Glutamatergic candidate genes in autism spectrum disorder: an overview. **Journal of Neural Transmission**, 121, 1081-1106, 2014.

COHEN, J.C. *et al.* Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Feb 7;103(6):1810-5, 2006.

CONRAD, D.F. *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. **Nature**, 464: 704-712, 2010.

CRAIG JM., *et al.* DNA Fragmentation Simulation Method (FSM) and Fragment Size Matching Improve aCGH Performance of FFPE Tissues. **Plos One**, 10.1371/0038881, 2012.

DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Firth, H.V. *et al* **Am.J.Hum.Genet** 84, 524-533, 2009 (DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010))

DE RUBEIS, S. *et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 209-215, 2014.

DE RUBEIS, S. e BUXBAUM, J. D. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity. **Human Molecular Genetics**, 24: R24-R31, 2015.

DESACHY, G. *et al.* Increased female autosomal burden of rare copy number variants in human populations and in autism families. **Molecular Psychiatry**, 1-6, 2015.

DEVLIN, B. e SCHERER, S. W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. **Current Opinion in Genetics e Development**, 22, 229-237, 2012.

DUAN, J. *et al.* Comparatives studies of copy number variation detection methods for next-generation sequencing technologies. **PLoS ONE**, 8(3), 2013.

EL-FISHAWY, P. e STATE, M. W. The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. **Psychiatr. Clin. North. Am.**, 33(1):83-105, 2010.

ENGCHUAN, W. *et al.* Performance of case-control rare copy number variation annotation in classification of autism. **BMC Medical Genomics**, 8(Suppl 1):57, 2015.

FLORIO, M. *et al.* Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1465-1470, 2015.

- FOLSTEIN, S.E. e ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nature**, 2(12):943-55, 2001.
- FOLSTEIN, S.E. The clinical spectrum of autism. **Clinical Neuroscience Research**. 6(3-4), 113-117, 2006.
- FOMBONNE, E. The epidemiology of autism: a review. **Psychol Med**. 29(4), 769-86, 1999.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric Research** 65, 591-8, 2009.
- FREEMAN, J.L. *et al*. Copy number variation: New insights in genome diversity. **Genome Research**, 16:949-961, 2006.
- FREITAG, C.M. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. **Molecular Psychiatry**, 12:2-22, 2007.
- FROMER, M. *et al*. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. **Am J Hum Genet**, 91(4), 597-607, 2012.
- FROMER, M. *et al*. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. **Nature**, 506(7487), 179-84, 2014.
- GAI, X. *et al*. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. **Molecular Psychiatry**, 17:402-411, 2012.
- GAUGLER, T. *et al*. Most genetic risk for autism resides with common variation. **Nat. Genet.** 46, 881–885, 2014.
- GAZZELLONE, M. J. *et al*. Copy number variaton in Han Chinese individuals with Autism Spectrum Disorder. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, 6:34, 2014.
- GESCHWIND, D.H. Autism: many genes, common pathways?. **National Institute of Health**, 135(3):391-395, 2008.

GHEBRANIOUS, N. *et al.* A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. **Am. J. Medical Genetics**, 143A: 1462-1471, 2007.

GIRIRAJAN, S. *et al.* Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. **N. Engl. J. Med.** 367, 1321–1331, 2012.

GIRIRAJAN, S. *et al.* Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with Autism Spectrum Disorder. **Am J Hum Genet.**, 92,221-237, 2013.

GLESSNER, J. T. *et al.* Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature**. 459, 569-573, 2009.

GUO, Y. *et al.* Comparative studies of exome copy number variation estimation tools using array comparative genomic hybridization as control. **BioMed Research International**, vol. 2013, 7p., 2013.

GUPTA, A.R. e STATE, M.W. Recent advances in the genetics of autism. **Biol. Psychiatry**, 61:429-437, 2007.

HARAKSINGH, R. R. *et al.* Genome-wide mapping of copy number variations in humans: comparative analysis of high resolution array platforms. **PLoS One**, 6, e27859, 2011.

HOLLANDER, E. *et al.* Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. **Psychiatry Research**, 117:11-16, 2003.

HOLLANDER, E. *et al.* A double-blind placebo-controlled trial of fluoxetine for repetitive behaviors and global severity in adult autism spectrum disorders. **Am J Psychiatry**, 169(3):292-9, 2012.

HU, V.W. *et al.* Gene Expression Profiling of Lymphoblasts from Autistic and Nonaffected Sib Pairs: Altered Pathways in Neuronal Development and Steroid Biosynthesis. **PLoS One.**, 3;4(6):e5775, 2009.

HURLES, M.E.; DERMITZAKIS, E.T. e TYLER-SMITH, C. The functional impact of structural variation in humans. **Trends Genet.**, 24(5):238-245, 2008.

HWANG, MY. *et al.* Combinatorial Approach to Estimate Copy Number Genotype Using Whole-Exome Sequencing Data. **Genomics**, 105 (3), 145-149, 2014.

IOSSIFOV, I. *et al.* De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. **Neuron**. 26;74(2):285-99, 2012.

ITSARA, A. *et al.* De novo rates and selection of large copy number variation. **Genome Res.** 20(11):1469-81, 2010.

IYER, J. e GIRIRAJAN, S. Gene discovery and functional assessment of rare copy-number variants in neurodevelopmental disorders. **Briefings in Functional Genomics**, 1-14, 2015.

JACQUEMONT, M. L. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. **J. Med. Genet.**, 43, 843-849, 2006.

JACQUEMONT, S. *et al.* A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. **Am J Hum Genet**, 94(3), 415-425, 2014.

JIANG, Y. *et al.* Detection of clinically relevant genetic variants in Autism Spectrum Disorder by whole-genome sequencing. **Am J Hum Genet.**, 93, 249-263, 2013.

JOSET, P. *et al.* Rostral growth of commissural axons requires the cell adhesion molecule *MDGA2*. **Neural Dev**, 4;6:22, 2011

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* 2, 217–250, 1943.

KEARNEY *et al.* Recommendations for systematic evaluation and clinical interpretation of CNVs. **Genetics in Medicine**, vol XX,XXX, 2011.

KIM, Y. S. *et al.* A comparison of DSM-IV pervasive developmental disorder and DSM-5 autism spectrum disorder prevalence in an epidemiologic sample. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, 53(5), 500-8, 2014.

KIM, Y.S. e LEVENTHAL, B.L. Genetic epidemiology and insights into interactive genetic and environmental effects in autism spectrum disorders. **Biol Psychiatry**, 77(1), 66-74, 2015.

KLAUCK, S.M. Genetics of autism spectrum disorder. **European Journal of Human Genetics**, 14, 714-720, 2006.

KRUMM, R. *et al.* Transmission disequilibrium of small CNVs in simplex autism. **Am J Hum Genet.**, 93, 595-606, 2013.

KUMAR, R.A. *et al.* Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. **Human Molecular Genetics**, 17(4):628-638, 2008.

KUSENDA, M. e SEBAT, J. The role of rare structural variants in the genetics of autism spectrum disorders. **Cytogenetic Genome Res.**, 123, 36-43, 2008.

LAI, M. C. *et al.* Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, 54(1), 11-24, 2015.

LEBLOND, C. S. *et al.* Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. **PLoS Genet**, 8(2), e1002521, 2012.

LEYFER, O.T. *et al.* **Comorbid Psychiatric Disorders in Children with Autism: Interview Development and Rates of Disorders.** **Journal of Autism and Developmental Disorders**, 36(37): 849 – 61, 2006.

LEVY D, *et al.* Rare *de novo* and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. **Neuron** 70(5):886-897, 2011.

LI, C. e HUNG-WONG, W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. **Genome Biol.** 2(8): RESEARCH0032, 2001.

- LI, X.; ZOU, H. e BROWN, W.T. Genes associated with autism spectrum disorder. **Brain Research Bulletin**, 88:543-552, 2012.
- LIN, M. *et al.* dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. **Bioinformatics**. 20(8):1233-40, 2004.
- LINTAS, C. e PERSICO, A.M. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. **J Med Genet**, 46(1):1-8, 2009.
- LIU, J. *et al.* A Genomewide Screen for Autism Susceptibility Loci. **Am. J. Hum. Genet.** 69:327-340, 2001.
- LOKE, Y. J.; HANNAN, A.J. e CRAIG, J.M. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. *Front Neurol.* 6:107, 2015.
- LUGNEGARD, T.; HALLERBÄCK, M.U. e GILLBERG, C. Psychiatric comorbidity in young adults with a clinical diagnosis of Asperger syndrome. **Research in Developmental Disabilities**. 32:1910-1917, 2011.
- LUGTENBERG, D. *et al.* Recurrent deletion of ZNF630 at Xp11.23 is not associated with mental retardation. **Am J Med Genet A**. 152A(3):638-45, 2010.
- LUPSKI, J.R. Genomic rearrangements and sporadic disease. **Nat Genet.**, 39(7 Suppl):S43-7, 2007
- MANOLIO, T.A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature** 461, 747-753, 2009.
- MANOLIO, T.A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. **N Engl J Med**. 363(2): 166-76, 2010.
- MARSHALL, C. R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. **Am. J. Hum. Genet.** 82:477–488, 2008.

MATSON, J.L. e KOSLOWSKI, A.M. The increasing prevalence of autism spectrum disorders. **Research in Autism Spectrum Disorders**, 5:418-425, 2011.

MATSON, M. L.; MATSON, J. L. e BEIGHLEY, J. S. Comorbidity of physical and motor problems in children with autism. **Research in Developmental Disabilities**, 32 (6): 2304-2308, 2011.

MERIKANGAS, A. K.; CORVIN, A. P. e GALLAGHER, L. Copy-number variants in neurodevelopmental disorders: promises and challenges. **Trends Genet.** Dec;25(12):536-44, 2009.

MERIKANGAS, A.K. *et al.* The phenotypic manifestations of rare genic CNVs in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Psychiatry**, 1-7, 2014.

MILES, J. H. *et al.* Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. **Am. J. Med. Genet.** A 135, 171–180, 2005.

MILES, J.H. *et al.* **Autism Spectrum Disorders**. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K. Adam MP, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2010.

MOECHARS, D. *et al.* Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, 26, 12055-12066, 2006.

MOLLOY, C.A., KEDDACHE, M. e MARTIN, L.J. Evidence for linkage on 21q and 7q in a subset of autism characterized by developmental regression. **Molecular Psychiatry**, 10:741-746, 2005.

MOREIRA, D. P. *et al.* Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. **PLoS One**, 9, e107705, 2014.

MOREIRA, E. S. *et al.* Detection of small copy number variations (CNVs) in Autism Spectrum Disorder (ASD) by custom array comparative genomic hybridization (aCGH). **Res, Autism Spectr Disord.**, 23, 145–151, 2016.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S.R. e RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics** 113(5):e472-86, 2004.

MUHLE, H. *et al.* The role of SLC2A1 in early onset and childhood absence epilepsies. **Epilepsy Res.** 105(1-2), 229-33, 2013.

MUÑOZ-AMATRIAÍN, M. *et al.* Distribution, functional impact, and origin mechanisms of copy number variation in the barley genome. **Genome Biology**, 14:R58, 1-17, 2013.

NAM, JY.*et al.* Evaluation of Somatic Copy Number Estimation Tools for Whole-Exome Sequencing Data. **Brief Bioinform**, 17 (2), 185-192, 2015

NAVA, C. *et al.* Analysis of the chromosome X exome in patients with autism spectrum disorders identified novel candidate genes, including TMLHE. **Transl Psychiatry**, 2(10), e179, 2012.

NEALE, B. M. *et al.* Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. **Nature**. 4;485(7397):242-5, 2012.

NEWINGTON, Jordan T. *et al.* Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid β and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production. **J Biol Chem**, 287(44), 37245-58, 2012.

NEWSCHAFFER, C.J. *et al.* Infant siblings and the investigation of autism risk factors. **J Neurodev Disord**, 4(1):7, 2012.

O'ROAK, B. J. *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. **Nature**. 4;485(7397):246-50, 2012.

PANG, T. The impact of genomics on global health. **American Journal of Public Health**, 92(7), 1077-1079, 2002.

PAULA, C. S. Autism in Brazil: perspectives from science and society. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 57(1):2-5, 2011.

PAULA, C.S. *et al.* Brief Report: prevalence of Pervasive Developmental disorder in Brazil: a pilot study. **J. Autism Dev. Disord.**, 41:1738-1742, 2011.

PAULA, C.S. *et al.* Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. **Journal of autism and developmental disorders**. Epub ahead of print, 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research** 29.9, 2001.

PINTO, D. *et al.* Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. **Am. J. Hum. Genet.** V. 94, pp. 677–694, 2014.

PINTO, D. *et al.* Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. **Nature**. 15;466(7304):368-72, 2010.

PIVEN, J. *et al.* Broader Autism Phenotype: Evidence From a Family History Study of Multiple-Incidence Autism Families. **Am. J. Psychiatry**, 154:185-190, 1997.

POULTNEY, J. *et al.* Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to Autism Spectrum Disorder. **Am J Hum Genet.**, 93, 607-619, 2013.

PRASAD, A. *et al.* A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. **G3**, 2, 1665-1685, 2012.

PRONTERA, P. *et al.* DPP6 gene disruption in a family with Gilles de la Tourette syndrome. **Neurogenetics**, 15(4), 237-42, 2014.

QIAO, Y. *et al.* Clinical application of 2.7M cytogenetics array for CNV detection in subjects with idiopathic autism and/or intellectual disability. **Clin. Genet.**, 83:145-154, 2013.

REDON, R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. **Nature**. 23;444(7118): 444-454, 2006.

REDON R, *et al.* Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, 444:444–454, 2006.

RETTNERER, K. *et al.* Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort. **American College of Medical Genetics and Genomics**, 2014.

RODRIGUEZ-REVENGA, L. *et al.* Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. **Genet Med**, 9(9), 600-6, 2007.

RIBEIRO, C.M. Estudo de genes candidatos aos Transtornos do Espectro Autista. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2013.

SANDERS, S. J. *et al.* De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. **Nature**, 4;485(7397):237-41, 2012.

SANDERS, S. J. *et al.* Insights into Autism Spectrum Disorder genomic architecture and biology from 71 Risk Loci. **Neuron**, 87, 1215-1233, 2015.

SANDIN, S. *et al.* The familial risk of autism. **JAMA**, v. 311, pp. 1770–1777, 2014.

SBACCHI, S. *et al.* Functional Annotation of Genes Overlapping Copy Number Variants in Autistic Patients: Focus on Axon Pathfinding. **Current Genomics**, 11, 136-145, 2010.

SCHAAF, C.P. *et al.* Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. **Human Molecular Genetics**, 20(17):3366-3375, 2011.

SEBAT, J. *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with autism. **Science**, 316:445–449, 2007.

SENER, E.F. Association of copy number variations in Autism Spectrum Disorders: a systematic review. **Chinese Journal of Biology**, vol. 2014, 9p., 2014.

SHU, M.T. *et al.* Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. **Bioinformatics Advance Access**, 2012.

SIU, W. K. *et al.* Diagnostic yield of array CGH in patients with Autism Spectrum Disorder in Hong Kong. **Clinical and Translational Medicine**, 5:18, 2016.

SMITH, A.J. *et al.* Human genes involved in copy number variation: mechanism of origin, functional effects and implications for disease. **Cytogenet. Genome Res.**, 123:17-26, 2008.

SMITH, C.L.; BOLTON, A. e NGUYEN, G. Genomic and Epigenomic Instability, Fragile Sites, Schizophrenia and Autism. **Current Genomics**, 11, 447-469, 2010.

STANKIEWICZ, P. e LUPSKI. J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annu. Rev. Med.**, 61:437-55, 2010.

STEFANSSON, H. *et al.* CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. **Nature**, 505, 2014.

SWANWICK, C.C.; LARSEN, E.C. e BANERJEE-BASU, S. Genetic heterogeneity of autism spectrum disorders , Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment, Prof. Stephen Deutsch (Ed.), ISBN: 978-953-307-495-5, InTech, 2011.

SZATMARI, P. *et al.* Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. **Nat Genet**, 39(3), 319-28, 2007.

TATTINI, L.; D'AURIZIO, R. e MAGI, A. Detection of genomic structural variants from next-generation sequencing data. **Front Bioeng Biotechnol**, 3, 92, 2015.

TEO, S. M. *et al.* Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. **Bioinformatics**, 28(21), 2711-18, 2012.

TEO SM., et al. Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. **Bioinformatics**, 28, 2711–2718, 2012.

TUCHMAN, R. e RAPIN, I. Epilepsy in autism. **Lancet Neurol**, 1(6), 352-8, 2002.

TURNER, T. N. *et al.* Genome sequencing of autism-affected families reveals disruption of putative noncoding regulatory DNA. **Am J Hum Genet**, 98(1), 58-74, 2016.

VASSON, A. *et al.* Custom oligonucleotide array-based CGH: a reliable diagnostic tool for detection of exonic copy-number changes in multiple targeted genes. **European Journal of Human Genetics**, 21, 977-987, 2013.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J. e COOK JR, E.H. Molecular genetics of autism spectrum disorder. **Molecular Psychiatry**, 9:819-832, 2004.

VORSTMAN, J.A.S. *et al.* Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. **Molecular Psychiatry**, 11(18-28), 2006.

WANG, K. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. **Nature**, 459(7246):528-33, 2009.

WANG, K. *et al.* PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. **Genome Research**, 17, 1665–1674, 2007.

WANG, K. e BUCAN, M. Copy Number Variation Detection via High-Density SNP Genotyping. **Cold Spring Harb. Protoc.**; DOI:10.1101/pdb.top46, 2008.

WEISS, L.A. *et al.* Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. **N. Engl. J. Med.** 358(7):667-675, 2008.

WEISS, L.A.; ARKING, D.E. e THE GENE DISCOVERY PROJECT OF JOHNS HOPKINS THE AUTISM CONSORTIUM. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. **Nature.** 8;461(7265):802-808, 2009.

WISZNIEWSKA, J. *et al.* Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. **European Journal of Human Genetics**, 22, 79-87, 2014.

XU, J. *et al.* Molecular Cytogenetics of Autism. **Current Genomics**, 5, 347-364, 2004.

YUEN, R.K.C *et al.* Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. **Nat Med**, 21(2), 185-91, 2015.

ZHAO, X. *et al.* A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. **PNAS**, 104(31):12831-12836, 2007.

ZHAO, M. *et al.* Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. **BMC Bioinformatics**, 14(Suppl 11):S1, 1-16, 2013.