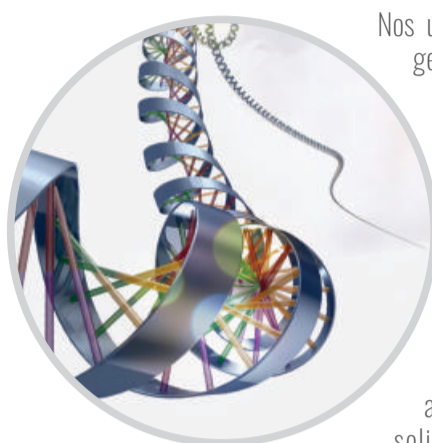


HIBRIDAÇÃO GENÔMICA em MICROARRAYS

VARIAÇÕES DE NÚMEROS DE CÓPIAS (CNVs) - DELEÇÕES E DUPLICAÇÕES



Nos últimos anos, a hibridação genômica em **microarrays** tornou-se uma ferramenta fundamental para o diagnóstico na área da genética. Existem dois tipos de hibridação genômica em **microarrays**: a comparativa (CGH-array) e o array de SNP (SNP-array). Esses exames são solicitados para análise de

Variações no Número de Cópias (CNV; Copy Number Variation) no genoma humano. CNVs são variantes genéticas que afetam segmentos genômicos maiores que 1kb (10.000 pb). Duas classes de variantes genéticas constituem as CNVs: as deleções e as duplicações (Figura 1). Deleções e duplicações ocorrem quando há, respectivamente, perda ou ganho de material genético. As deleções ou duplicações podem incluir um ou mais genes. CNV é a classe de variante genética mais frequente em nosso genoma, sendo uma das principais causas de doenças genéticas⁽¹⁾.

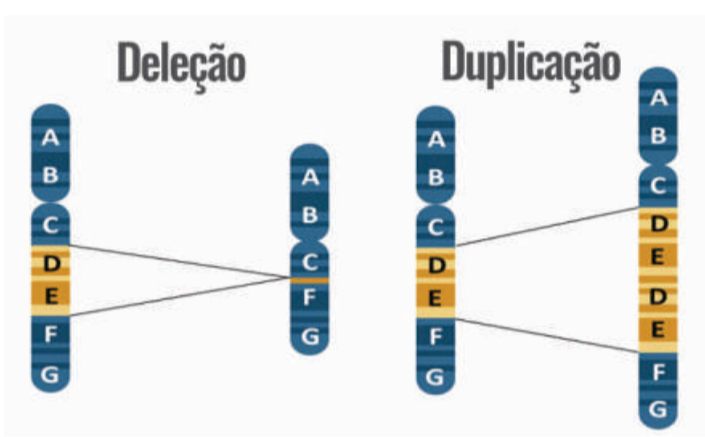


Figura 1. Variações de número de cópias de DNA: Duas classes de variantes genéticas constituem as CNVs: as deleções e as duplicações. Deleções e duplicações ocorrem quando há, respectivamente, perda ou ganho de material genético. Deleções ou duplicações que afetem, no mínimo, de 5 a 10 Mb podem ser visualizadas ao microscópio óptico, sendo portanto detectadas no exame de cariótipo. O exame de hibridação genômica em microarray tem resolução superior ao cariótipo e pode detectar CNVs que tenham pelo menos 100 Kb, embora a faixa de detecção desse exame dependa da resolução da plataforma de array utilizada.

Desde a década 80 foram descritas várias síndromes de microdeleções e síndromes de microduplicações, como a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A (CMT1A; MIM 601097) e a síndrome Williams-Beuren (WBS; MIM 194050). Na análise de indivíduos com doenças de manifestação precoce, a aplicação de hibridação genômica em **microarrays** tem permitido não somente detectar a causa genética de síndromes reconhecíveis clinicamente, mas também identificar variantes patogênicas naqueles pacientes nos quais não há uma suspeita clínica evidente. Por exemplo, estudos de pacientes com deficiência intelectual, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou malformações congênitas identificaram CNVs relacionadas ao quadro clínico em 15 a 20% dos casos⁽²⁾. CNVs também são responsáveis por 8% dos casos de encefalopatias epilépticas⁽³⁾ e 28% dos casos de doenças de movimento associados a alterações de neurodesenvolvimento ou comportamento ocorrem devido a presença de CNVs⁽⁴⁾.

É importante ressaltar que CNVs também são encontradas em indivíduos clinicamente normais, pois constituem a principal fonte de variação genética na população humana⁽⁵⁾. Essas CNVs polimórficas contribuem para a propensão ao desenvolvimento de doenças, variabilidade fenotípica, respostas a drogas e susceptibilidade a patógenos.

De acordo com as recomendações do **American College of Medical Genetics and Genomics** (ACMG) as CNVs devem ser classificadas de acordo com o impacto clínico que causam em seus portadores^(6,7). Dessa forma as CNVs são classificadas como benigna, provavelmente benigna, variante de significado clínico incerto, provavelmente patogênica ou patogênica. O acesso a banco de dados disponíveis gratuitamente tem se tornado uma importante ferramenta para diferenciar CNVs patogênicas e benignas. O banco de dados **DECIPHER** documenta as CNVs identificadas em pacientes com alterações clínicas. Já o banco de dados **Database of Genomic Variants** reúne as CNVs detectadas em indivíduos da população geral.

A HIBRIDAÇÃO GENÔMICA EM MICROARRAY SUBSTITUI O CARIÓTIPO NA ANÁLISE DE DELEÇÕES E DUPLICAÇÕES

Ao investigar os 46 cromossomos do paciente, a técnica de cariótipo permite identificar deleções e duplicações e têm sido utilizada para diagnósticos genéticos há mais 50 anos. Devido a resolução dessa técnica é preciso, no entanto, que a deleção ou duplicação afete no mínimo de 5 a 10 Mb para que a alteração seja visualizada ao microscópio óptico. A hibridação genômica em **microarray** aumentou o poder de resolução da análise cromossômica global do nível de megabase para kilobase; consequentemente CNVs não detectáveis pela técnica de cariótipo passaram a ser identificados.

Com base em uma extensa revisão na literatura, o **International Standard Cytogenomic Array (ISCA)** Consortium recomendou a aplicação inicial do **microarray** no estudo de pacientes com malformações congênitas múltiplas, autismo, atraso de desenvolvimento ou deficiência intelectual de causas genéticas desconhecidas⁽²⁾. O custo da técnica seria compensado pela elevada taxa de detecção de CNVs (entre 15 a 20% em comparação aos 3% detectados com o cariótipo). O estudo preconizou que o uso do cariótipo deve limitar-se ao estudo de pacientes com síndromes cromossômicas conhecidas (exemplo Síndrome de Down), histórico de rearranjos cromossômico na família ou de abortos de repetição.

Por tratar-se de uma técnica *genome-wide*, ou seja, que analisa milhares de regiões do genoma humano ao mesmo tempo, a técnica de hibridação em **microarray** permite identificar alterações na maioria dos genes já descritos. Essa é uma vantagem em relação à técnica alvo-específica de FISH, que requer a priori o conhecimento dos genes que possam estar alterados no paciente para que seja utilizada uma sonda da região de interesse.

Dessa forma a hibridação genômica em **microarray** vêm rapidamente substituindo o cariótipo e o FISH nos diagnósticos genéticos.

CGH-ARRAY

Na técnica de hibridação genômica comparativa baseada em **microarray** de DNA (a-CGH; CGHarray), o DNA controle e o DNA teste, marcados com fluorocromos diferentes, competem pela hibridação a sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina; deleções ou duplicações são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos (Figura 2).

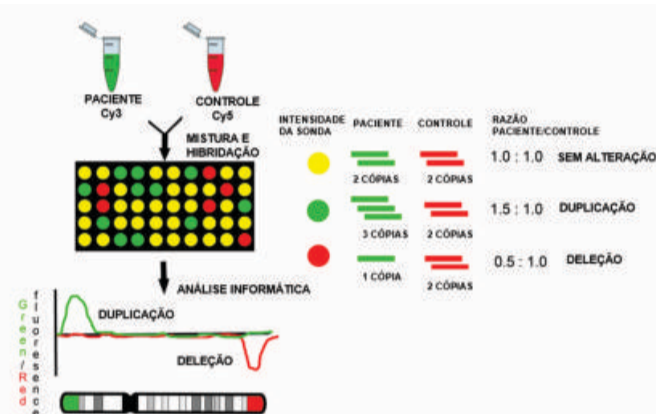


Figura 2. CGH-array: Na técnica de hibridação genômica comparativa baseada em **microarray** de DNA (a-CGH; CGH-array), o DNA controle e o DNA do paciente são marcados com fluorocromos diferentes, Cy5 e Cy3, respectivamente. Após a etapa de marcação o DNA controle e o DNA do paciente competem pela hibridação a sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina. A lâmina é escaneada e os resultados brutos são analisados por softwares apropriados que identificam regiões de variações de número de cópias no genoma humano. Deleções ou duplicações são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos. O excesso de fluorescência do fluorocromo da marcação do DNA do paciente reflete a presença de uma duplicação na região da sonda analisada no genoma do paciente. O excesso de fluorescência do fluorocromo da marcação do DNA do controle reflete a presença de uma deleção na região da sonda analisada no genoma do paciente. Figura adaptada de Karampetsou et al. *Microarray Technology for the Diagnosis of Fetal Chromosomal Aberrations: Which Platform Should We Use?* J Clin Med. 3:663-78, 2014.

A resolução do **microarray** é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas, em sua cobertura parcial ou total do genoma. Os primeiros **arrays** utilizavam sondas clonadas em BACs (cromossomos artificiais de bactérias), porém plataformas mais recentes têm oligonucleotídeos como alvos de hibridação. Esses **oligoarrays** permitem maior flexibilidade na confecção de sondas, maior cobertura genômica e resolução superior aos **arrays** de BAC.

SNP-ARRAY

Outro tipo de **microarray** possuem sondas de SNP (**Single Nucleotide Polymorphisms**), que permitem não somente a avaliação de deleções ou duplicações, mas a genotipagem. Nessa abordagem, a amostra de um único paciente é hibridada ao **array** e alterações no número de cópias são detectadas pela comparação com hibridações de controles realizados separadamente⁽⁸⁾. Além de perdas e ganhos de segmentos que caracterizam CNVs, os **arrays** de SNP têm a vantagem de detectar perdas de heterozigose e permitir identificar dissomia uniparental (UPD). A UPD é definida pela presença no cariótipo de um par de cromossomos homólogos ou de segmentos cromossômicos homólogos com mesma origem parental. A UPD causa doenças relacionadas ao **imprinting genômico** (exemplo: síndromes de Prader-Willi, síndrome de Angelman e síndrome de Silver-Russell), ou seja, da expressão gênica dependente da origem parental. Dessa forma o **microarray** de SNP deve ser solicitado quando há suspeita de doenças de **imprinting genômico**.

NOSSO TESTE

O Centro de Genomas® oferece o exame de hibridação genômica comparativa por **array** (CGH-array). Nossa lâmina de CGH-array contém 180.000 sondas dispostas em uma plataforma de **microarray** customizada. O desenho customizado da nossa lâmina de 180k possui alta resolução para detecção de regiões de variações de número de cópias (CNVs) -deleções e duplicações - localizadas em todo o genoma, incluindo 308 regiões que foram previamente associadas à doenças e 140 genes relacionados com o TEA (Transtorno do Espectro Autista).

Este exame faz parte do Rol de Procedimentos da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) através da Resolução Normativa (RN) 167 da ANS.

RECOMENDAÇÃO DO TESTE

- Pacientes com deficiência intelectual ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor;
- Pacientes com diagnóstico ou suspeita clínica de autismo;
- Pacientes com anomalias congênitas;
- Pacientes com genitália ambígua;
- Pacientes com baixa estatura ou déficit pondero-estatural;
- Pacientes com suspeita de síndromes de microdeleção ou microduplicação reconhecíveis clinicamente;
- Pacientes com cariótipo contendo cromossomo marcador;
- Pacientes com a presença de material cromossômico adicional de origem indeterminada no cariótipo.

Para saber mais, Acesse o nosso site:
<http://www.centrodegenomas.com.br>

REFERÊNCIAS:

1. Zhang F et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10:451-81, 2009.
2. Miller et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 86:749-64, 2010.
3. Nicholl et al. Epilepsy with cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 162B:24-35, 2013.
4. Dale et al. Microdeletions detected using chromosome microarray in children with suspected genetic movement disorders: a single-centre study. *Dev Med Child Neurol* 2012;54:618-23.
5. Redon et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 444:444-54, 2006.
6. South et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genetics in Medicine* 15, 901-909, 2013.
7. Vermeesch JR et al. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 33:906-15, 2012.
8. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782-92, 2005.



WWW.CENTRODEGENOMAS.COM.BR

NTD: Rua Leandro Dupré, 967 - VI. Clementino - São Paulo / SP.

ADM: Rua Loefgreen 1304, 1º andar - VI. Clementino - São Paulo / SP.

Autoria: Dr^a Ana Carolina S. Fonseca, PhD

Texto adaptado. Ana Carolina dos Santos Fonseca. Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadro clínico. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ano de conclusão: 2011.

Todas as edições estão disponíveis para consulta, acesse: www.cartamolecular.com.br



centro de genomas®
referência em medicina molecular e genética avançada