

Variantes genéticas estruturais numa população de indivíduos com Perturbações do Espectro do Autismo (PEA): caracterização genómica, heritabilidade e correlações clínicas

Inês **Conceição**¹, Catarina **Correia**¹, Bárbara **Oliveira**¹,
Margarida **Rama**¹, Guiomar **Oliveira**², Astrid **Moura Vicente**¹
astrid.vicente@insa.min-saude.pt

(1) Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças
Não Transmissíveis, INSA.

(2) Centro de Desenvolvimento da Criança,
Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar de Coimbra.

_As Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) constituem uma patologia complexa do neurodesenvolvimento, clinicamente heterogénea e com etiologia pouco clara ⁽¹⁾. Foi considerada no passado uma doença rara, mas as estimativas de prevalência têm vindo a aumentar nas últimas décadas, como consequência de uma maior sensibilização da parte dos pais, clínicos e professores, e eventualmente também devido a fatores genéticos e ambientais desconhecidos.

_Fatores genéticos contribuem claramente para a etiologia das PEA, e na última década foram feitos progressos significativos na sua identificação e caracterização, conhecimento esse que está cautelosamente a ser incorporado na prática clínica ^(2,3). Os estudos de epidemiologia genética mais recentes, realizados em grandes amostras populacionais por consórcios de investigação internacionais, evidenciaram o papel preponderante na etiologia das PEA de variantes genéticas raras, convergentes num número reduzido de vias biológicas. Em particular, o rastreio genómico de variantes estruturais submicroscópicas designadas *Copy Number Variants* (CNVs), que causam deleções e duplicações de genes ou partes de genes, mostrou que estes CNVs são responsáveis pelo autismo numa fração substancial de casos ⁽⁴⁾. No entanto, a grande heterogeneidade encontrada nestas deleções e duplicações implica que o significado clínico de cada CNV tem de ser devidamente esclarecido, antes deste conhecimento poder ser traduzido em ferramentas de diagnóstico molecular para as PEA. A caracterização extensa dos CNVs em populações de pacientes, incluindo taxas de recorrência em PEA, segregação em famílias, conteúdo génico e correlações clínicas, é fundamental para melhorar a distinção entre variantes estruturais benignas e variantes causais de patologia, definindo os aspetos clínicos e genómicos com melhor poder preditivo para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular.

_No âmbito do consórcio internacional *Autism Genome Project* (AGP) foi efetuado um rastreio de CNVs em mais de 3000 indivíduos com autismo e seus pais. A equipa do INSA, em colaboração com o Hospital Pediátrico de Coimbra, participou nesta investigação com a análise de 342 amostras de pacientes portugueses e seus pais, obtendo um mapa detalhado dos CNVs destes indivíduos. No presente estudo, procedemos à caracterização detalhada e validação dos CNVs com potencial significado clínico identificados nesta população. Inicialmente foram selecionados CNVs génicos (contendo genes ou partes de genes deletados ou duplicados) ausentes em indivíduos controlo (N = 5459) ou cuja sequência não tinha uma sobreposição significativa (<20%) com CNVs benignos descritos em bases de dados públicas. Foram ainda incluídos todos os CNVs que continham genes ou regiões síndromicas associadas às PEA. Um total de 180 CNVs génicos foi identificado, variando entre 5 kb e 3 Mb, a maioria dos quais (62%) eram deleções. Estes CNVs continham entre um (73% dos CNVs génicos) a 25 genes num único CNV, e 23.5% eram *de novo*. A maioria dos CNVs (86%) estava presente num único indivíduo, com exceção de 23 CNVs comuns (frequência de 1% ou mais na população analisada), distribuídos por seis regiões genómicas, e que foram identificados em 26 indivíduos. Cada um destes CNVs comuns estava presente em 3 a 6 pacientes, e incluía genes/regiões anteriormente implicados no autismo, tais como a região 16p13.11 (N = 3), e os genes *DPYD* (N = 5), *PARK2* (N = 6), e *VPS13B* (N = 3).

_Para categorização fenotípica, foram analisadas as correlações entre características genómicas dos 180 CNVs génicos (por ex. tamanho, deleções ou duplicações, nº de genes por CNV, conteúdo génico) e a apresentação clínica dos 139 indivíduos em que estavam presentes. Foram definidas como categorias fenotípicas a existência de défice intelectual (QI<70, N= 59), de dismorfismos menor (N = 17) e de história familiar de perturbação neuropsiquiátrica (N=78) (**Gráfico 1**). Nesta amostra encontraram-se mais deleções do que duplicações, independentemente da apresentação clínica. Indivíduos com défice intelectual, dismorfismos menor e/ou história familiar apresentavam uma tendência para uma maior sobrecarga de CNVs génicos, assim como para um maior número de genes em CNVs, por indivíduo, e um maior tamanho médio dos CNVs.

_A análise genética dos pais mostrou que 76,5% dos CNVs génicos eram herdados de um ou ambos os progenitores. Usando a informação obtida através de ferramentas que permitem avaliar traços sub-clínicos de autismo, como o *Social Responsiveness Scale* (SRS) e o *Broad Autism Phenotype Questionnaire* (BAPQ) ^(5,6) foi analisada a correlação entre a heritabilidade dos CNVs e cotações positivas nestes questionários para os pais. Um excesso significativo de traços sub-clínicos de autismo foi observado em pais que transmitiam CNVs, para os resultados do BAPQ, no que diz respeito à personalidade "indiferente" (*aloof*), caracterizada pela falta de interesse na interação social (**Gráfico 2**). Análise de correlações entre pares de familiares (pais/filhos, mães/filhos e pais/mães), utilizando o questionário SRS, mostraram ainda uma correlação significativa entre ambos os pais.

→ continua

artigos breves_ n. 4

Gráfico 1: Relação entre as diferentes categorias fenotípicas dos indivíduos com PEA e as várias características dos CNVs destes indivíduos.

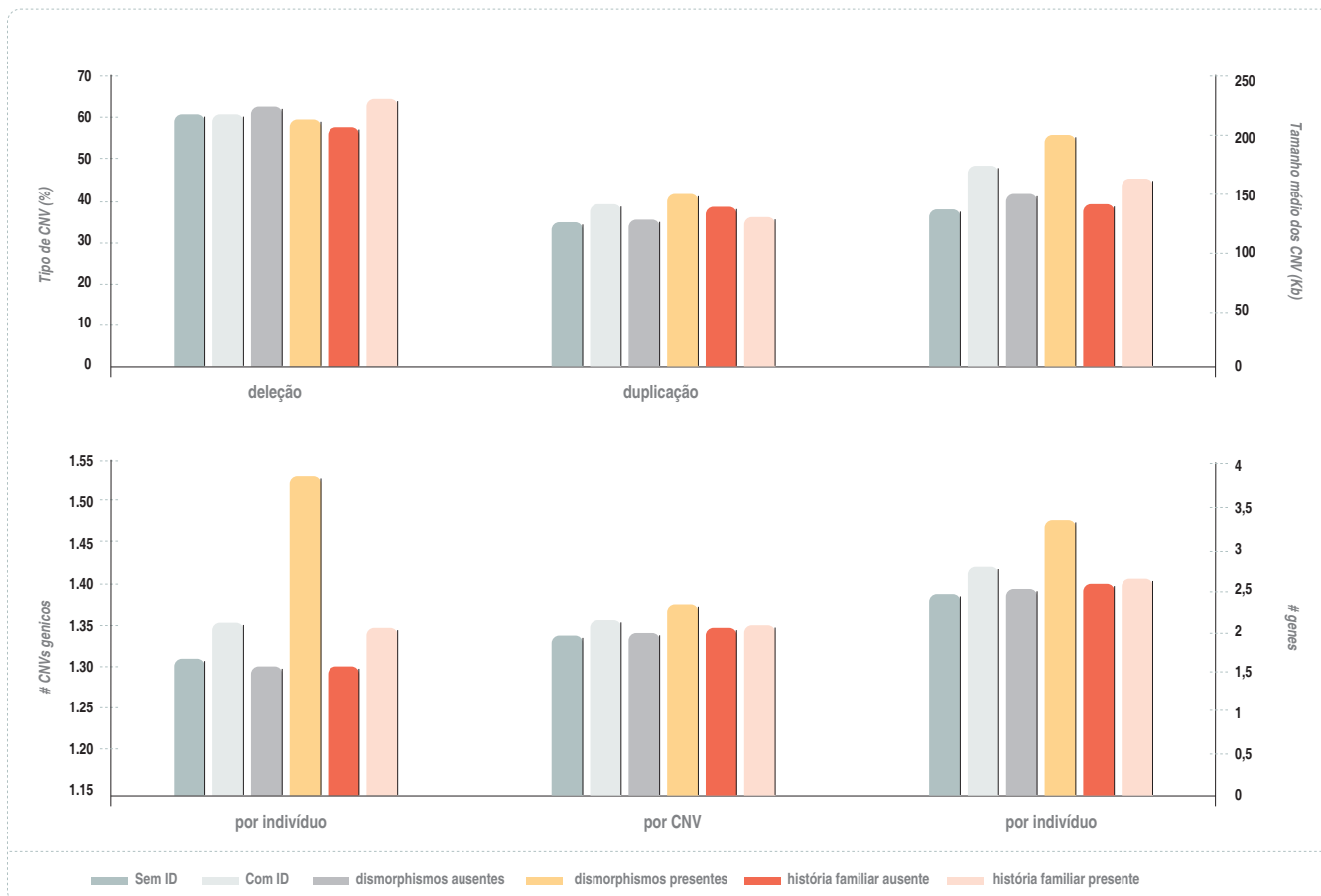
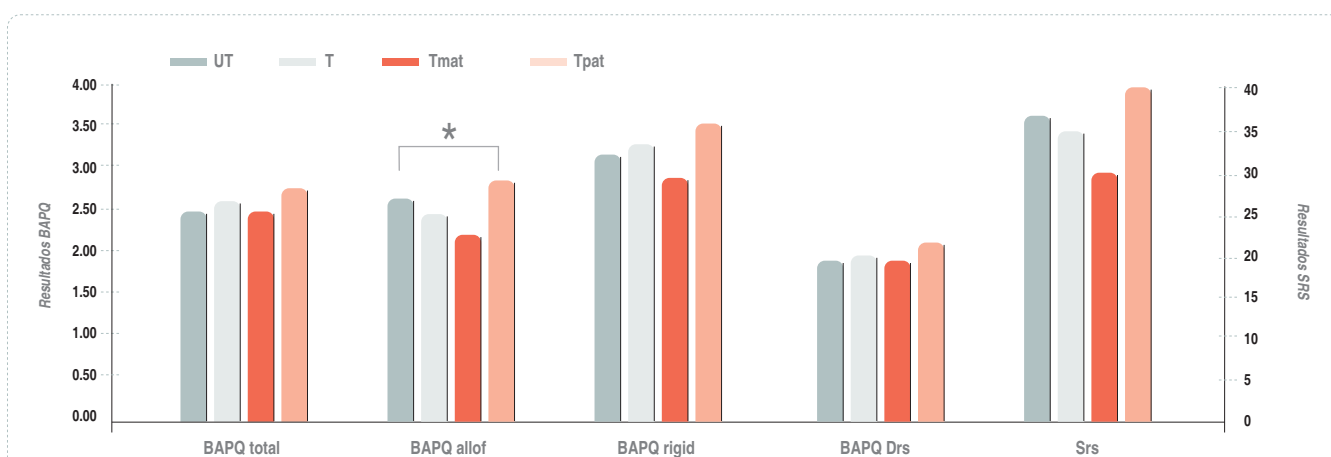


Gráfico 2: Média dos resultados do BAPQ e SRS realizados aos pais vs heritabilidade dos CNVs, usando o teste U de Mann-Whitney.



Foram feitas comparações entre: 1) UT vs T, 2) UT vs Tmat e 3) UT vs Tpat. UT, progenitores que não transmitem CNVs genéticos; T, progenitores que transmitem CNVs; Tmat, mães que transmitem CNVs; Tpat, pais que transmitem CNVs. Personalidade indiferente (aloof), falta de interesse na interação social; personalidade pragmática (prs), com défices de comunicação; personalidade rígida (rigid), falta de capacidade de adaptação. * $P < 0,05$.

artigos breves_ n. 4

_Para identificação de possíveis vias fisiológicas convergentes dos genes contidos nestes CNVs, foi ainda realizada uma análise de *networks* de genes, partindo dos 314 genes duplicados ou deletados. Esta análise definiu uma *network* compreendendo 85 genes, uma fração dos quais previamente implicados nas PEA (*p.ex.* *CACNA1C*, *PTEN*, *FOXP1*, *NRG1*, *NRG4*, *CHD7*). Utilizando os algoritmos de definição de vias fisiológicas KEGG e GO, observou-se um enriquecimento nesta *network* de genes implicados no desenvolvimento do sistema nervoso central e na regulação de processos catabólicos celulares (*Figura 1*), consistente com resultados de estudos genéticos e funcionais prévios para as PEA.

_O rastreio e caracterização de CNVs em pacientes com PEA com informação clínica detalhada, e a sua integração em bases de dados internacionais, tem possibilitado uma distinção cada vez mais rigorosa entre variantes patológicas e variantes benignas. No estudo presente foi possível um aumento substancial no número de diagnósticos etiológicos neste grupo de pacientes. A implementação de algoritmos de *data mining* permitirão uma categorização ainda mais rigorosa dos CNVs de acordo com os dados clínicos, na ausência de hipóteses estabelecidas *a priori*. O estudo mostra também a importância de não limitar os diagnósticos etiológicos aos CNVs *de novo*, uma vez que em casos de CNVs transmitidos os progenitores por vezes apresentam traços sub-clínicos de PEA, que ao não serem aparentes poderão mascarar um CNV patológico que é transmitido. Finalmente, este estudo identificou uma *network* funcional de genes implicados no autismo, contribuindo para o conhecimento das vias fisiológicas na base desta patologia.

Figura 1:  Network funcional de 85 genes contidos nos CNVs identificados nesta amostra de pacientes, usando o software String (7).



artigos breves_ n. 4

Referências bibliográficas:

- (1) Losh M, Sullivan PF, Trembath D, et al. Current developments in the genetics of autism: from phenome to genome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67:829-837.
- (2) Anney R, Klei L, Pinto D, et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet.* 2010;19:4072-4082.
- (3) Holt R, Sykes NH, Conceição IC, et al. CNVs leading to fusion-transcripts in individuals with autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:1141-1147.
- (4) Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature.* 2010;466:368-372.
- (5) Constantino JN, Todd RD. Intergenerational transmission of subthreshold autistic traits in the general population. *Biol Psychiatry.* 2005;57:655-660.
- (6) Hurley RS, Losh M, Parlier M, et al. The broad autism phenotype questionnaire. *J Autism Dev Disord.* 2007;37:1679-1690.
- (7) Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue): D808-15.