

CNVs em loci de suscetibilidade com penetrância incompleta: da certeza no diagnóstico à incerteza no prognóstico

Susceptibility loci CNVs with incomplete penetrance: from an accurate diagnosis to an uncertain prognosis

Sílvia Serafim, Bárbara Marques, Hildeberto Correia

hildeberto.correia@insa.min-saude.pt

Unidade de Citogenética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

O teste genético de *array* é a primeira linha no diagnóstico genético pós-natal de situações como défice cognitivo, autismo e anomalias congénitas. Em pré-natal, este teste está indicado em gravidezes com anomalias ecográficas. Comparativamente ao cariótipo possibilita um aumento no diagnóstico entre 10-20% em pós-natal e 5-10% em pré-natal. No entanto, também identifica alterações associadas a fenótipos variáveis, com penetrância incompleta (CNVs-LS), conferindo aumento da suscetibilidade a doenças do neuro-desenvolvimento, mas com prognóstico incerto. Neste estudo pretendemos definir um conjunto de CNVs-LS e a sua penetrância, estimada com dados da literatura, aferindo a sua ocorrência na coorte com teste genético de *array* realizado no INSA-DG-UCI. Definiram-se 21 CNVs-LS e dum total de 835 diagnósticos em pós-natal e 317 em pré-natal, identificaram-se 36 casos pós-natal e 11 em pré-natal, correspondendo a 4,3% e 3,5% do total, respetivamente. A penetrância estimada para as CNVs-LS apresenta variabilidade inter-publicações, e inter-fenótipo na população estudada, embora seja concordante para algumas variantes. Aferir a penetrância por variante é uma tarefa complexa e a análise por teste genético de *array* acarreta ainda incertezas no diagnóstico e aconselhamento genético, dificuldades apenas superadas com o decorrer do tempo, estudo de mais coortes e conhecimento das interações genótipo-ambiente-fenótipo.

_Abstract

Chromosomal microarray analysis (CMA) is the first-tier test for developmental delay, autism spectrum disorders, and congenital abnormalities in postnatal diagnosis and for ultrasound abnormalities in prenatal diagnosis. CMA when compared to karyotype can increase the detection of variants with clinical significance up to 10-20% in postnatal diagnosis and up to 5-18% in prenatal diagnosis. Nevertheless CMA also detects incomplete penetrance neuro-susceptibility loci variants (CNV-SL), with clinical significance but uncertain outcome. The aim of this study is to identify from the literature a set of CNV-SL, and the corresponding penetrance, determining the occurrence in the cohort from INSA-DG-UCI. From a total number of 835 postnatal samples and 317 prenatal samples we have identified 36 and 11 cases, respectively, with a variant in the 21 CNV-SL set obtained from the literature. The estimated penetrance presents some inter-publication variability, especially when concerning samples with different phenotypes, with some variants showing concordance, nevertheless. Estimating penetrance for CNV-SL is a complex task and clarifying uncertainty in these cases is still far from being accomplished.

Only time, analysis of larger cohorts, and future knowledge of genotype-environment-phenotype interactions will overcome this difficulty allowing to improve the estimation of clinical impact for the subject or carriers in the family.

_Introdução

Anomalias cromossómicas, como a trissomia 21, e algumas microdeleções ou microduplicações, como a microdeleção em 22q11.2, são alterações genéticas reconhecíveis e claramente identificáveis no contexto do diagnóstico de doenças genéticas.

Desde a introdução do estudo global do genoma por *microarray*, com uma resolução muito superior ao cariótipo, que muitas alterações no número de cópia (*Copy Number Variants* – CNVs) têm vindo a ser identificadas. Estas CNVs podem ser variantes benignas ou polimórficas, encontradas em indivíduos saudáveis, ou serem a causa de situações sindrómicas ou de patologias específicas.

A maior capacidade de identificar CNVs com significado clínico patogénico tornou o teste genético de *array* a primeira linha no diagnóstico genético de uma diversidade de situações como perturbações do desenvolvimento intelectual (PDI), perturbações do espectro do autismo (PEA) e anomalias congénitas (AC) (1,2). Neste grupo de doentes o teste genético de *array* possibilita um aumento entre 10 a 20% de diagnósticos quando comparado ao cariótipo (3,4). Em diagnóstico pré-natal (DPN), o teste genético de *array* está indicado em gravidezes onde se identificam anomalias ecográficas no feto, possibilitando um aumento de diagnósticos entre 5 a 10% nos casos em que o cariótipo é normal (5-7).

No entanto, o teste genético de *array* também possibilita a identificação de CNVs de significado clínico incerto e de CNVs não solicitadas. Existe, ainda, a possibilidade de identificar CNVs que, apesar de serem classificadas por alguns autores como patogénicas, na verdade conferem um aumento da suscetibilidade a doenças do neuro-desenvolvimento, sendo designadas de CNVs associadas a *loci* de suscetibilidade (CNVs-LS) (8,9). Algumas destas variantes são identificadas em *coortes* associadas a diferentes patologias, apresentando uma grande variabilidade fenotípica, podendo também ser identificadas em progenitores fenotipicamente normais, apresentando assim penetrância incompleta, por vezes baixa (10,11). Penetrância é definida como a proporção, ou percentagem, de indivíduos com um genótipo (ou CNV) associado a uma patologia e que mostram sinais ou sintomas dessa patologia (12).

As CNVs-LS, especialmente no âmbito do DPN, são de difícil interpretação já que as implicações clínicas não são possíveis de prever.

_Objetivos

O propósito deste estudo é definir um conjunto de CNVs-LS, que sejam consensuais na literatura, e a penetrância estimada para cada uma, aferindo a sua ocorrência e percentagem na *coorte* com teste genético de *array* da Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA-DG-UCI), no âmbito do diagnóstico pré-natal (DPN), entre janeiro de 2015 e agosto de 2018, e no diagnóstico pós-natal (PN), entre janeiro de 2012 e agosto de 2018.

_Material e métodos

Para a seleção das CNVs-LS foram pesquisadas na literatura publicações que incluíssem referências a este tipo de CNVs, em contexto de DPN e/ou PN. Das publicações identificadas foram excluídas as que usavam apenas dados do mesmo artigo (14).

Foram selecionadas quatro publicações, duas das quais estabelecem uma metodologia para atingir a estimativa da penetrância para CNVs-LS (13,14), e outras duas que referem a identificação de CNVs-LS no contexto do DPN (8,15).

Com base nestes quatro artigos, foram selecionadas as CNVs-LS a incluir neste estudo e, seguidamente, analisada a *coorte* com teste genético de *array* realizados no âmbito de DPN e de PN no INSA-DG-UCI, estabelecendo a ocorrência para cada.

A penetrância estimada para cada CNVs-LS foi compilada de artigos (13,14) e reunida na tabela final com resultados.

_Resultados

Foi definido um total de 21 CNVs-LS, entre deleções e duplicações, que incluem 12 regiões genómicas distribuídas ao longo de cinco cromossomas diferentes.

De um total de 835 diagnósticos em PN e 317 em DPN, foram identificados 341 casos anormais (40,1%) e 56 casos anormais (17,8%), respetivamente. Destes foram selecionadas os que apresentavam alterações correspondentes às 21 CNVs-LS definidas anteriormente.

Na [tabela 1](#) e [gráfico 1](#) encontram-se representadas as várias CNVs, com a penetrância estimada nos artigos consultados, o número de casos em DPN e PN identificados em cada uma e, quando possível, o tipo de herança.

Tabela 1: CNVs em LS, penetrâncias estimadas em diferentes publicações e dados da *coorte* do INSA-DG-UCI

CNVs em LS	Nº cópia	C.G. (hg 19/GRCh37) (aprox.)	% penetrância Rosenfeld (14) (PDI/PEA/AC)	% penetrância Kirov (13)				INSA-DG-UCI_PN (janeiro 2012 – agosto 2018)			INSA-DG-UCI_DPN (janeiro 2015 – agosto 2018)		
				Kirov (PDI/PEA/AC)	Kirov (SCZ)	Kirov Total	Vassos (SCZ)	Nº	% total	Herança	Nº	% total	Herança
1q21.1 (proximal) <i>RBM8A</i>	dup	145.0-145.0	17,3	–	–	–	–	0	–	–	0	–	–
1q21.1 (distal) <i>GJA5</i>	del	146.5-147.4	36,9	35,0	5,2	40,0	6,1	0	–	–	0	–	–
	dup		29,1	18	2,9	21	–	0	–	–	0	–	–
15q11.2 <i>NIPA1</i>	del	22.8-23.09	10,4	10,7	2,0	13,0	2,0	5	0,59	3h; 2nd	3	0,94	1h; 2nd
	dup		–	–	–	–	–	7	0,84	1h; 6nd	1	0,32	nd
15q13.3	del	31.13-32.48	–	35,0	4,7	40,0	7,4	0	–	–	0	–	–
	dup		–	8,0	1,8	9,8	–	3	0,36	3h	0	–	–
15q13.3 <i>CHRNA7</i>	del	32.01-32.45	–	–	–	100	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	3,1	0,9	4,0	–	2	0,24	nd	1	0,32	nd
16p13.11 <i>MYH11</i>	del	15.51-16.30	13,1	14,0	1,7	15,0	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	8,4	2,2	10,6	2,4	4	0,48	1h; 3nd	1	0,32	1h
16p12.1	del	21.94-22.46	12,3	13,0	13,1	16,0	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	3,9	0,7	4,8	–	0	–	–	0	–	–
16p11.2 (distal) <i>SH2B1</i>	del	28.82-29.05	62,4	23,0	2,6	26,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
	dup		11,2	5,3	0,7	6,0	–	0	–	–	0	–	–
16p11.2 <i>TBX6</i>	del	29.64-30.20	46,8	31,0	0,5	31,0	–	5	0,59	1dn; 4nd	0	–	–
	dup		27,2	26,0	8,0	34,0	6,9						
17q12 <i>HNF1B</i>	del	34.81-36.20	34,4	39,0	4,0	43,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
	dup		21,1	17,0	1,7	19,0	–	2	0,24	1h; 1nd	2	0,63	nd
22q11.21 <i>TBX1</i>	dup	19.02-20.26	21,9	14,0	0,2	14,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
								3	0,36	nd	0	–	–
22q11.2	dup	21.91-23.65	–	16,0	0,0	17,0	–	2	0,24	nd	0	–	–
Total								36	4,3		11	3,5	

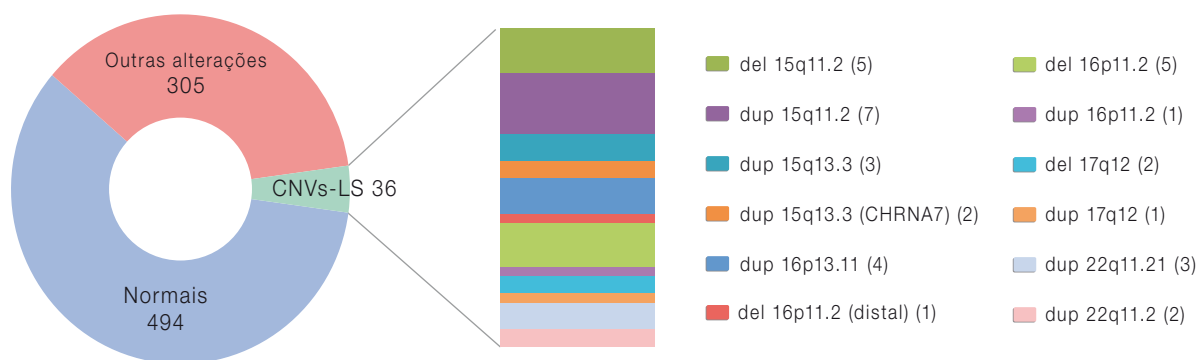
CNVs = Copy Number Variation; CG = Coordenadas Genómicas; PDI/PEA/AC = Perturbações do Desenvolvimento Intelectual, Perturbações do Espectro do Autismo e Anomalias Congénitas; SCZ = Esquizofrenia; LS = Loci de susceptibilidade; DPN = Diagnóstico Pré-Natal; PN = Diagnóstico Pós-Natal; dn = de novo; h = herdada (materna ou paterna); nd = não disponível.

Total de todas as amostras no período de tempo: 1401; PN = 835; DPN = 317; Total de PN Anormais = 341; Total de DPN Anormais = 56

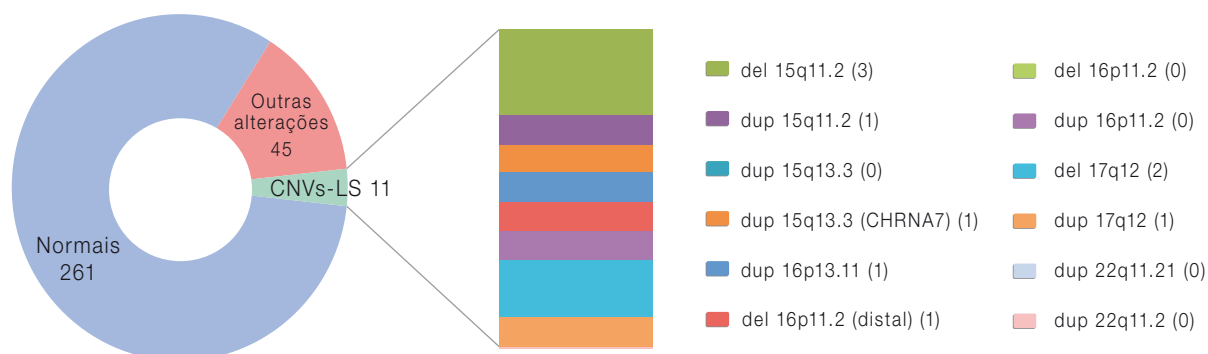
Nota: Foi identificado um progenitor com del 16p12.1 no decurso do estudo familiar de uma CNV não incluída neste estudo. Esse resultado não está representado na tabela.

Gráfico 1: **↓ Coorte com teste genético de array realizado no INSA-DG-UCI no âmbito do diagnóstico pós-natal (A) e pré-natal (B).**

A – pós-natal



B – pré-natal



Outras alterações=CNVs patogénicas, provavelmente patogénicas e incertas, excluindo as CNVs-LS

CNVs-LS=CNVs em *loci* de susceptibilidade. Em destaque à direita encontram-se as CNVs-LS subdividas por região cromossómica.

_Discussão e conclusão

Apesar da diferença do número de amostras no grupo PN e DPN, em que um corresponde ao dobro do espaço temporal do outro, a percentagem de casos com CNVs-LS é muito semelhante nos dois grupos (~4%). A partir dos dados da [tabela 1](#) pode-se extrapolar, em média, a identificação de 4 indivíduos afetados por cada 100 testados. Se considerarmos que a indicação clínica para DPN apenas inclui alterações identificáveis ecograficamente, o equivalente a AC no PN, e sabendo que a maioria das CNVs-LS fenotipicamente estão associadas a al-

terações neuro-cognitivas, coloca-se a questão sobre a real prevalência destas alterações na população em geral. O valor de 4%, se incluirmos todas as CNVs-LS identificadas neste estudo, pode ser considerado relativamente frequente, embora nem todas as CNVs-LS tenham idêntica representação na nossa *coorte*, nem grau de penetrância estabelecido ([tabela 1](#)). Relativamente à penetrância, existe alguma variabilidade entre as publicações, particularmente quando selecionam a amostra com base num fenótipo (*coortes* com esquizofrenia *versus coortes* com PDI, PEA e AC), embora para algumas variantes exista maior concordância inter-publicações ([tabela 1](#)).

Aferir a estimativa do grau de penetrância por variante é uma tarefa complexa, quer pela identificação do real número de indivíduos fenotipicamente normais, quer pela própria designação de “normal”. Se por um lado alguns indivíduos apenas são diagnosticados como afetados no decurso de estudos familiares, por outro, a identificação de uma CNV familiar pode induzir alguma subjetividade na avaliação clínica dos indivíduos portadores (12).

Igualmente, situações em que se identificam, no decurso de estudos familiares para outras variantes, progenitores portadores de uma CNVs-LS (nota na [tabela 1](#)), colocam outras questões no aconselhamento genético, em que a variante foi um achado incidental, não existindo ainda indivíduos aparentemente afetados. Nessas situações, existe risco de recorrência numa futura gravidez, mas com um desfecho incerto, independentemente do grau de penetrância da variante, não sendo possível determinar se o feto será afetado. No entanto, uma penetrância mais elevada confere um risco maior de um indivíduo ter alguma manifestação clínica. Assim CNVs-LS encontram-se entre o tipo de alterações que mais desafios representam no aconselhamento genético, quer devido à penetrância incompleta quer pelo fenótipo variável, não permitindo prever a dimensão das implicações clínicas no indivíduo ou familiares portadores.

O estudo de alta resolução do genoma por teste genético de *array*, tal como o exoma clínico num futuro próximo, traz ainda muitas incertezas. Assim, é importante realizar mais estudos de *coortes*, no sentido de esclarecer as interações genótipo-ambiente na determinação do fenótipo, com vista à melhoria do diagnóstico de alta resolução e aconselhamento genético.

Referências bibliográficas:

- (1) Miller DT, Adam MP, Aradhya S, 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.* 2010;86(5):749-64. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869000/>
- (2) Shen Y, Dies KA, Holm IA, et al. ; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2010;125(4):e727-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247857/>
- (3) Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171215/>
- (4) Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009;11(3):139-46.
- (5) Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2012;32(10):976-85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491694/>
- (6) Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549418/>
- (7) de Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LC, et al. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(2):139-46.
- (8) Srebniak MI, Joosten M, Knapen MFCM, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;51(4):445-52.
- (9) Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med.* 2008;359:1685-1699.
- (10) Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1321-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3494411/>
- (11) Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet.* 2011;45:203-26.
- (12) Benn PA. Prenatal counseling and the detection of copy-number variants. *Genet Med.* 2013;15(4):316-7.
- (13) Kirov G, Rees E, Walters JT, et al. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biol Psychiatry.* 2014;75(5):378-85. Epub 2013 Aug 28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229045/>
- (14) Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med.* 2013;15(6):478-81. Epub 2012 Dec 20.
- (15) Brabbing-Goldstein D, Reches A, Svirsky R, et al. Dilemmas in genetic counseling for low-penetrance neuro-susceptibility loci detected on prenatal chromosomal microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):247.e1-247.e12. Epub 2017 Nov 14.