FLAVIA BALBO PIAZZON

**Investigação clínica e citogenética molecular em
pacientes com atraso de desenvolvimento
neuropsicomotor associado à malformação congênita**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leslie Domenici Kulikowski

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Chong Ae Kim

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2015

FLAVIA BALBO PIAZZON

**Investigação clínica e citogenética molecular em
pacientes com atraso de desenvolvimento
neuropsicomotor associado à malformação congênita**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leslie Domenici Kulikowski

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Chong Ae Kim

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada

Piazzon, Flavia Balbo

Investigação clínica e citogenética molecular em pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita / Flavia Balbo Piazzon. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Coorientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Anormalidades congênitas 2.Deficiência intelectual 3.Estudo de associação genômica ampla 4.Dosagem de genes 5.Variações do número de cópias de DNA 6.Aconselhamento genético

DEDICATÓRIA

***“O céu, meu pai, faz zuada, sorri feliz e se enche de causos.
De palhaços, da mulher vestida de sol. Se enche das harpas de Sião e
dos homens de barro. Se enche de amor. De humor. O céu inteiro espera.
Se prepara. Corre. Transpira nossa agonia.”***

Ariano Suassuna – Alto da Compadecida

***Aos meus queridos avôs,
Hoje o céu está em festa!
Muito obrigada por colocarem a Medicina, a Ética e a fome por
conhecimento em meu DNA!***

AGRADECIMENTOS

Aos **Meus Pais, José Roberto e Patricia**, por me darem o bem mais precioso que existe, a Vida e possibilitar que tudo começasse, por terem investido na minha educação e me apoiado até aqui.

Aos meus queridos irmãos, **Roberta e Rafael**, pela paciência e amor incondicional sempre.

À minha amada **tia Lu**, mãe postiça de todas as horas, amiga e companheira de muitas reflexões e risadas, muita obrigada pelo exemplo de “CDF” da família.

Aos meus tão jovens e queridos gatos, **Frida & Schiró**, muito obrigada por me ensinar a amar e ser amada da maneira mais profunda e impensada. Muito obrigada pela companhia nos finais de semana não mais solitários de estudo.

À minha especial e amorosa madrasta **Márcia e meu novo amado irmão Tuco-tuco**, muito obrigada pela paz e amor que enriquecem nossa família.

À toda a minha família que mesmo distante, mas próxima ao coração, torce por mim.

Aos estimados pacientes e suas famílias, principalmente do Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar e do Instituto da Criança, por colaborarem e participarem deste estudo de corpo e alma.

À L. e P. por me mostrarem tão cedo a complexidade da família com doença rara e que o caminho do amor ultrapassa barreiras.

À minha doce amiga e orientadora, **Prof^a. Dr^a. Leslie Domenici Kulikowski**, que conseguiu enxergar meu potencial escondido e acreditou, mais que eu própria, que iríamos conseguir. Tenho muita honra em ser sua aluna e mais ainda de termos conseguido estreitar os laços no decorrer desta bonita caminhada. Te admiro muito!

À minha coorientadora, **Profª. Drª. Chong Ae Kim**, pelo respeito e apoio sempre.

À **Profª. Drª. Maria Isabel Melaragno** e seu grupo, muito obrigada pela colaboração com as amostras dos pacientes da Disciplina de Genética da UNIFESP e pelas sugestões na elaboração deste estudo.

Aos coordenadores do Laboratório de Investigação em Pediatria Clínica (LIM36) **Profª. Drª. Magda Carneiro Sampaio** e **Prof. Dr. Carlos Moreira Filho**, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Raymundo Azevedo**, pela confiança e estímulo depositados em nosso grupo de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Alberto Duarte** e ao **Departamento de Patologia da FMUSP** pela colaboração durante a execução das técnicas de citogenômica.

Aos **funcionários** do Departamento de Patologia, **Thiago, Vera e Welluma**, sempre tão colaborativos.

Ao **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Animal – **ESALQ/USP** – Piracicaba-SP, e ao **Ricardo Brassaloti** e **Gustavo Gasparin** pela imensa ajuda e pelo carinho na recepção e realização da técnica de *array*.

Aos queridos amigos da “**Velha Guarda**” do Laboratório de Citogenômica, **Alê, Roberta, Verve, Marília, Gil, Thaís e Amom...** Como foi bom aprender enquanto ríamos! Aos “**Jovens**” do grupo meu agradecimento e os recordo da responsabilidade de manterem a fundamental “*Good Vibe*”!!

À minha **família escolhida**, os amigos de muitas vidas, **Jujuba (Miga), Maro, Fló, Deee, Lainosa, Tati, Pri, Cleusoca, Crisoca, Karol Maia, Lu Frizzon, Mari, Magnera, Maripa, Ana Pilla, ZeMoa, Fer, Li, Lina, Ana...** Obrigada pelos conselhos e momentos inesquecíveis. Amo mais que brigadeiro!

Ao meu *personal trainer*, **Paulo Meireles**, agradeço as manhãs de treinos para a saúde do corpo e principalmente da alma.

À minha querida amiga e exemplo de médica geneticista, **Vera Meloni**.

Ao meu querido amigo e chefe, **Fernando Kok**, muito obrigada por acreditar em mim e me inspirar sempre. Sem nossas conversas este trabalho não seria possível.

Aos **médicos e residentes** da Unidade de Genética do Instituto da Criança pela colaboração e ensinamentos.

Ao médico geneticista **Caio Robledo Quaio**, aos **médicos da UTI Neonatal** e aos **funcionários e Diretoria** do Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar por possibilitar que essa nova tecnologia em genética fosse oferecida aos seus pacientes tão carentes.

À **Mendelics Análise Genômica**, meus chefes David Schlesinger, André Valim e João Paulo Kitajima, amigas geneticistas Fabíola Monteiro, Larissa Athayde Costa e Gabriela Rodrigues, além de toda equipe, agradeço pelo apoio na minha ausência, o que foi essencial para a realização deste trabalho.

À equipe da **Espectrometria de Massas do Laboratório de Triagem Neonatal da APAE DE SÃO PAULO**, Sonia Hadachi, Luciana Garcia, Heloise Martins, Gisele Ascari, Elisangela Neves, Jessica Viana, Talita Belarmino, Regiane Luongo, Danielle Arita, Raquel Rodrigues, entre outros, muito obrigada pela amizade e suporte quando a minha cabeça estava a mil com muitas atividades.

Aos meus amigos da Genética Molecular do Grupo Fleury, **Wagner Antonio da Rosa Baratela**, **Carlos Eugênio de Andrade** e **Caio Robledo Quaio**, agradeço os ensinamentos adquiridos sobre *array* e Genética Médica.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”***

Clarice Lispector

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese de doutorado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1. Rearranjos submicroscópicos relacionados a malformações e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor.....	26
2.2. Métodos de detecção de rearranjos submicroscópicos.....	31
2.3. Desafio na análise do número de cópias gênicas.....	34
2.4. A realidade da Genética Médica no Brasil.....	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Geral.....	39
3.2. Específicos.....	39
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
4.1. Casuística.....	41
4.2. Técnicas utilizadas.....	42
4.2.1. Isolamento e quantificação de DNA.....	42
4.2.2. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA).....	43
4.2.3. Técnica de triagem genômica por <i>array</i>	43
4.2.4. Análise de dados.....	44
5. RESULTADO.....	47
5.1. Análise dos resultados.....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
8. CONCLUSÕES.....	79
9. ANEXOS.....	83
10. REFERÊNCIAS.....	121

Apêndices

Lista de Figuras

Figura 1	A evolução das técnicas citogenômicas.....	33
-		
Figura 2	Além da banda G: <i>iceberg</i> ilustrando a dificuldade na elucidação de casos citogenômicos complexos.....	36
-		
Figura 3	Critérios de inclusão e exclusão na casuística deste estudo.....	42
-		
Figura 4 -	Fluxo do trabalho	42
Figura 5	Fluxograma e classificação dos resultados de <i>array</i>	48
-		
Figura 6	Fácies dos pacientes e linfedema do paciente 56 com CNVs patogênicos.....	53
-		
Figura 7	Fácies dos pacientes com CNVs benignos. P13 foi posteriormente diagnosticada com a síndrome do X frágil.....	53
-		
Figura 8	(A) Cariótipo com bandas G e MLPA ilustrando os achados da SWB e duplo Y. (B, C, D) Ilustram as alterações genômicas encontradas nos cromossomos 7, 13, X e Y no <i>array</i> de paciente 55 (P55).....	56-57
-		
Figura 9	(A) Esquema ilustrando as regiões 9p (barra verde) e 20p (barra vermelha) envolvidas na translocação desbalanceada na paciente (em cima) e balanceada na mãe (embaixo). (B e C) FISH para 9p23 com a sonda RP11-143N16 (verde) e para a região 20p13 com a sonda RP11-137P16 (vermelha), mostrando um sinal vermelho ao invés do verde no cromossomo 9 da paciente (B) e a translocação equilibrada na mãe (C).....	60
-		
Figura 10	Fluxograma apresentando as diretrizes para o atendimento clínico.....	78
-		

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Síndromes de microduplicações e microdeleções cromossômicas.....	30
Tabela 2 -	Demonstração de todas as alterações genômicas encontradas relacionadas à DI.....	31
Tabela 3 -	Resultados obtidos pelas técnicas citogenômicas dos 71 pacientes.....	50

RESUMO E ABSTRACT

Piazzon FB. *Investigação clínica e citogenética molecular em pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Com a sofisticação das técnicas de análise do DNA, a medicina moderna tem à sua disposição boas possibilidades para elucidar quadros clínicos indefinidos em pacientes que possuem microrrearranjos cromossômicos complexos. O desenvolvimento da técnica de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) aliado à tecnologia dos *arrays* (WGAS – *whole genome array screening*) possibilitou analisar de uma só vez, diferentes regiões de interesse clínico no genoma humano. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo estudar pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) associado à malformação congênita (MC) com cariótipo prévio normal ou inconclusivo. **Material e métodos:** Participaram do estudo 71 pacientes com ADNPM associado à MC que foram analisados utilizando o teste de MLPA com os *kits* P036 e P064, seguido de WGAS com as diferentes plataformas (*Agilent, Affymetrix e Illumina*). **Resultados:** Entre os 33 pacientes com alterações patogênicas e de significado clínico incerto (VOUS) encontramos: 12 pacientes com deleção, 5 com duplicação e 16 com duplicações e deleções (dup/del) concomitantes. Foram 29 pacientes com alterações patogênicas conclusivas, 4 pacientes com CNVs classificadas como VOUS e 15 pacientes tiveram resultado de *array* normal além dos outros 23 que apresentaram alterações benignas, ou por não apresentarem genes na região alterada, ou por serem genes sem fenótipos descritos, ou ainda, as alterações foram herdadas de genitores normais. Na casuística total foram encontrados 4 pacientes com regiões de perda de heterozigosidade. **Conclusões:** A utilização de uma estratégia combinada utilizando diferentes *kits* de MLPA, com capacidade para detectar as principais microalterações genômicas patogênicas conhecidas, associada à aplicação do WGAS possibilitou a detecção de alterações submicroscópicas, bem como a correlação clínica adequada para pacientes não diagnosticados pela citogenética clássica. Dessa forma, nosso estudo sugere um novo modelo

para a aplicação combinada desses testes que representa uma alternativa de bom custo-benefício para a triagem genômica e definição diagnóstica dos pacientes com quadros sindrômicos complexos e suas famílias.

Descritores: Anormalidades congênitas; Deficiência intelectual; Estudo de associação genômica ampla; Dosagem de genes; Variações do número de cópias de DNA; Aconselhamento genético.

Piazzon FB. *Clinical and molecular cytogenetics investigation in patients with psychomotor delay associated with congenital malformation* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Introduction: The recent technological advances on DNA-based techniques have established in modern medicine good opportunities to elucidate undefined clinical cases in patients with complex chromosomal microrearrangements. The performance of MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) technique together with array technologies (WGAS – *whole genome array screening*) created the possibility of one single experiment to analyze different regions of interest in the human genome. **Objective:** Patients with psychomotor delay (PSMD) associated with multiple congenital anomalies who had normal or inconclusive G-band-karyotype (MCA) were studied in order to understand the genotype-phenotype correlations. **Material and methods:** This study involved 71 patients with psychomotor delay (PSMD) associated with multiple congenital anomalies (MCA) analyzed by MLPA (P036 and P064 kits), followed by WGAS different platforms (*Agilent, Affymetrix e Illumina*[®]). **Results:** Among 33 patients with pathogenic and uncertain (VOUS) copy number variations (CNV) were found: 12 deletions, 5 duplications and 16 concomitant duplication and deletion (dup/del). There were 29 patients with conclusive pathogenic findings, 4 patients with VOUS and 16 patients with normal array, but others 23 patients with benign results, which means there is no gene content in the region involved, or because these genes were not linked to phenotype, or even due to CNVs inherited of healthy parents. From the whole casuistic, 4 individuals presented loss of heterozygosity (LOH) regions. **Conclusions:** The use of a combined strategy of analysis (MLPA - WGAS) with a high capacity to detect pathogenic CNVs allows unraveling microscopic imbalances, and consequently, offers an adequate clinical correlation for patients not previously diagnosed by classical cytogenetics. In conclusion, this study suggests a new model for the combined application of these techniques, which represents an optimal alternative for a genomic screening and diagnostic establishment in patients with rare complex disorders and their families.

Descriptors: Congenital abnormalities; Intellectual disability; Genome-wide association study; Gene dosage; DNA copy number variations; Genetic counseling.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Anormalidades na arquitetura genômica podem gerar diferentes manifestações clínicas como as malformações congênitas (MC) e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM). No entanto, o diagnóstico claro dessas anormalidades nem sempre é possível (Shaffer, 2005).

As alterações genômicas também constituem causa frequente de abortamento, defeitos congênitos e deficiência intelectual e são verificadas em cerca de 0,7 a 0,8% dos recém nascidos vivos, em 5% dos natimortos e em mais de 50% dos abortos espontâneos ocorridos no primeiro trimestre de gestação (Christiansen et al., 2008) sendo, portanto imprescindível sua inequívoca identificação.

Desde 1956, com a determinação exata do número de cromossomos da espécie humana, o estudo citogenético clássico (cariotipagem com bandas) permitiu o diagnóstico de diversas doenças genômicas, as causadas por aneuploidias ou por grandes alterações cromossômicas estruturais, como as translocações, inserções, inversões, deleções e duplicações (Harper et al., 2006).

As anormalidades genômicas maiores, que incluem deleções, duplicações e translocações cromossômicas no limite de 5 a 10 Mb de tamanho, podem ser identificadas por meio da citogenética clássica (cariótipo com bandamento G). Já as anormalidades genômicas menores, que constituem alterações sutis na sequência e envolvem substituição de bases, deleções ou inserções de poucos nucleotídeos, necessitam de investigação por meio da citogenética molecular como, por exemplo, pelo método de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), e suas variantes (Trask, 2002; Salman et al., 2004), ou ainda mais recentemente pela investigação do genoma utilizando plataformas de arranjos de oligonucleotídeos e/ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNP-*array*) para triagem genômica completa.

Assim, com a sofisticação da citogenética molecular no estudo das variações genômicas estruturais, a medicina moderna tem agora, à sua disposição, métodos citogenômicos de análise capazes de elucidar quadros

clínicos indefinidos em pacientes que apresentam microrrearranjos cromossômicos complexos.

Com o advento de métodos moleculares como a técnica de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), os laboratórios especializados no estudo genético tiveram à sua disposição uma eficiente ferramenta de triagem genômica para pacientes com deficiência intelectual, malformações congênitas e dismorfias (Christofolini et al., 2010; Dutra et al., 2011).

E, atualmente, com a implantação da tecnologia de *array* (WGAS – *whole genome array screening*) é possível analisar, de uma só vez, regiões de interesse em todo o genoma para triar rearranjos genômicos desequilibrados que explicariam os sinais e sintomas dos pacientes em avaliação genética por diversos motivos como: múltiplas malformações congênitas, deficiência intelectual, transtorno do espectro autista (TEA), déficit de atenção e hiperatividade, infertilidade e outros.

O desenvolvimento de plataformas com maior resolução, já possibilita a detecção de aproximadamente 99% das anormalidades cromossômicas desbalanceadas em um único experimento (Martin; Warburton, 2015).

Assim, estudamos pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) associado à malformação congênita (MC), sem diagnóstico clínico definitivo, e suas famílias, aplicando as novas técnicas citogenômicas de análise do DNA para compreender melhor a etiologia desses quadros e realizar o aconselhamento genético adequado.

———— ***REVISÃO DA LITERATURA***

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Rearranjos submicroscópicos relacionados a malformações e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor

A etiologia cromossômica de diversos fenótipos clínicos, incluindo as malformações, foi bem estudada utilizando as técnicas de citogenética convencional, mas estas técnicas nem sempre eram completamente conclusivas. Com o aparecimento dos métodos de citogenética molecular, os microrrearranjos estruturais, principalmente as microdeleções, puderam ser identificadas e os relatos cariótipo-fenótipo tornaram-se mais bem descritos na literatura (Trask, 2002).

Considerando que deleção é a quebra de um segmento cromossômico com a subsequente perda desse material genético, quando o segmento cromossômico deletado é menor que 5 a 10 Mb, não é possível sua detecção pelo cariótipo tradicional, sendo então considerado uma microdeleção genômica, que pode ser de 1 kb a 10 Mb.

Tanto as deleções quanto as duplicações submicroscópicas estão igualmente envolvidas na etiologia de fenótipos clínicos e são responsáveis por aproximadamente 15% das mutações nas doenças monogênicas. Sendo que na maioria das vezes, as microduplicações patológicas afetam os portadores com menor gravidade (Shaffer; Lupski, 2000).

Belanger et al., 2009 identificaram e caracterizaram a deleção 22q11.2 em 29 pacientes portadores utilizando métodos de citogenética molecular, mostrando que os fenótipos das entidades, síndrome de Di George, síndrome velocardiofacial e síndrome conotruncal com anomalias faciais, antes conhecidas como doenças distintas, fazem parte de um único espectro clínico, no qual as cardiopatias conotruncais são frequentes, além de fenda palatina, dismorfias faciais, voz anasalada relacionada à insuficiência velofaríngea, hipoplasia de timo, deficiência intelectual e/ou alterações psiquiátricas, além de outras alterações.

A microdeleção na região 7q11.2 encontrada em pacientes com a Síndrome de Williams-Beuren, está diretamente relacionada com fenótipo facial

típico, estenose aórtica supravalvar e comportamento afável peculiar (Robinson et al., 1996). Sbruzzi et al. (2010) tentam correlacionar o fenótipo da mesma síndrome com a presença ou ausência de marcadores polimórficos nessa região genômica, identificados pela técnica de MLPA, levando em consideração principalmente o gene da elastina (*ELN*), comumente ausente na síndrome e responsável por boa parte de seu fenótipo.

Diversos relatos na literatura reconhecem que a deleção 1p36 é a síndrome de microdeleção terminal mais comum, com incidência estimada em 1:5000 indivíduos, sendo que seu fenótipo consiste em atraso de linguagem, características faciais como sobrancelhas estreitas, olhos fundos, hipoplasia de face média, ponte nasal alargada e achatada, além de filtro nasal longo com queixo proeminente (Shapira et al., 1997; Gajecka et al., 2007; Battaglia et al., 2008; D'Angelo et al., 2006).

Da mesma forma, van Bever et al. (2005) encontraram uma microdeleção na região subtelomérica do braço longo do cromossomo 1 utilizando as técnicas de MLPA e *array*, em um paciente com deficiência intelectual e múltiplas anomalias congênitas, a maioria delas envolvendo alterações na linha média.

Outras alterações genômicas submicroscópicas de importância clínica, são as síndromes de rearranjos cromossômicos recíprocos, como a duplicação ou a deleção de cerca de 1,5 Mb em 17p11.2, associadas respectivamente, à síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (Pentao et al., 1992) e à neuropatia hereditária com predisposição à paralisia de pressão (*hereditary neuropathy with liability to pressure palsy*) descrita por Chance et al. (1994). As síndromes já bem documentadas e produto das microdeleções ou duplicações podem ser conferidas na Tabela 1.

As alterações submicroscópicas não detectadas na cariotipagem clássica também estão implicadas no atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e da deficiência intelectual (DI). Sabemos que a DI ocorre em 2 a 3% dos recém-nascidos na população geral e na maioria dos casos a etiologia permanece não elucidada. Em apenas 5% das DI não explicadas, são detectadas alterações por cariótipo convencional, e quando o diagnóstico

causal é encontrado, há melhora no manejo clínico e no aconselhamento genético das famílias (Garcia et al., 2004).

Com o desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular surgiram as sondas únicas para a investigação das regiões subteloméricas usadas tanto pelo método de FISH quanto por MLPA. Assim, a disponibilidade dessas sondas tornou possível a correlação dessas regiões com o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e a deficiência intelectual (Knigh; Flint, 2000).

Um estudo pioneiro foi realizado no Reino Unido com 466 crianças portadoras de DI idiopática e cariótipo normal. Esse estudo mostrou uma frequência de aproximadamente 5% de rearranjos subteloméricos, sendo que cerca de 50% desses rearranjos haviam sido herdados de pais portadores de rearranjos na forma balanceada (Knigh et al., 1999).

Em 2002, Biesecker revisou os dados da literatura sobre os rearranjos cromossômicos subteloméricos em pacientes com deficiência intelectual idiopática. Dos 2000 casos avaliados em 14 trabalhos publicados, aproximadamente 6% demonstraram rearranjos subteloméricos com uma taxa de 50% de rearranjos herdados de pais portadores de rearranjo balanceado.

Baseado na arquitetura genômica complexa das regiões subteloméricas, associada à alta taxa de recombinação desses *loci* e ao elevado número de genes nas regiões cromossômicas distais, Ledbetter (1992) postulou que rearranjos subteloméricos microscópicos teriam grande importância na etiologia de malformações congênitas múltiplas e na deficiência intelectual.

Em um estudo baseado nos testes solicitados na rotina laboratorial, Ravnan et al., 2006 encontraram uma incidência de microrrearranjos clinicamente relevantes de aproximadamente 2,5%. Em um estudo similar, Ballif et al., 2007 estudaram 7000 casos com cariótipo normal por CGH-array e encontraram uma frequência de rearranjos em torno de 2,4%.

Todos esses estudos mostraram a relevância clínica das alterações subteloméricas, mas há indícios que microrrearranjos em outras regiões genômicas ou até mesmo as variações no número de cópias (CNVs, do inglês

Copy Number Variation) futuramente possam estar mais relacionados à etiologia da DI, tornando sua investigação fundamental em casos de portadores de malformações e ADNPM com cariótipo normal (lafrate et al., 2004).

Na Tabela 2 estão demonstradas as principais alterações genômicas encontradas relacionadas a DI. Síndromes bem documentadas cujo produto das microdeleções ou duplicações podem ser conferidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Algumas síndromes de microduplicações e microdeleções cromossômicas.

Clinical applications of array CGH				
Condition	Array	Size	Clinical features or main findings	Refs
Novel deletion syndromes				
16p11.2–p12.12	Clinical aCGH (SignatureChip); NimbleGen; Affymetrix 250 K SNP	7.1–8.7 Mb	DD and DF (flat facies, downsloping palpebral fissures, low-set and malformed ears and eye anomalies)	[43]
15q24	Targeted NimbleGen (147 bp ^a)	1.7–3.9 Mb	FTT, microcephaly, digital abnormalities, hypospadias and loose connective tissue	[44]
17q21.31	Tiling WG: 32,477 BAC clones	600 kb	Moderate MR, hypotonia and DF (ptosis, blepharophimosis, abnormal ears, tubular nose, long columella and a broad chin)	[45]
15q13.3	WG, targeted to segmental dup: 2007 BACs	1.5 Mb	Mild dysmorphic features, MR and seizures	[46]
21q22.12	Clinical aCGH (Baylor, V.5, 6.3); Agilent 244 K	Minimal overlapping del: 0.7 Mb	Syndromic thrombocytopenia, acute myelogenous leukemia, FTT, DD	[47]
Microduplication syndromes				
17p11.2	A custom 17p array (83 BAC/PAC clones)	3.7 Mb nonrecurrent: 1.3–15.2 Mb	Infantile hypotonia, failure to thrive, MR, congenital anomalies and autistic features	[48]
7q11.23	Clinical aCGH (Baylor, V.5)	1.55 Mb	Variable DD, prominent language delay, autistic features	[49,50]
Xq28	Clinical aCGH (Baylor, V.4&5)	0.2–2.2 Mb	X-linked GDD/MR and recurrent infections in males	[51,52]
22q11.2	Clinical aCGH (Baylor, V.4&5) & WG 44 K Oligo (Agilent)	3-Mb-common, 1.5-Mb-nested, • 1 to • 2-Mb – atypical	A variety of dup. observed. The phenotypes were generally mild and highly variable; familial transmission was frequently observed	[53]
Delineation of known syndromes				
'Atypical' 22q11.2 del	Clinical aCGH (Baylor, V.4&5); Agilent 244 K	1.4–2.1 Mb	Distinct from classic del: DF, DD, growth delay, skeletal abnormalities	[54]
1p36 del	Clinical aCGH (Baylor, V.5); Agilent 44B	2.97–14.69 Mb	Atypical: FTT, DD, DF, feeding difficulties, seizures, cardiovascular and limb anomalies, microcephaly	[55]
4p-syndrome	BAC 1-Mb ^a & chr.4 tiling BAC	1.9–30 Mb	Genotype–phenotype correlation. 1.4 Mb del. in a patient with mild phenotype. Mapping the genes causing different physical findings	[56]
GCPS	Custom 44K Agilent for 10 Mb around GLI3 gene (730 bp ^a)	59 kb–10.4 Mb	GCPS can be caused by GLI3 deletions or duplications of widely varying sizes. Deletion size correlates with disease severity	[57]
Angelman syndrome	Custom: BAC of 15q (>1 Mb ^a) & Subtel	5–6 Mb	Class I deletions had more autism, lower IQ, and lower expressive language	[58]
PWS	Clinical aCGH (Baylor, V.6); Custom 15q-specific oligo-array	175 Kb	The data provide a conclusive evidence that deficiency of HBII-85 snoRNAs causes the key characteristics of the PWS phenotype	[59]
Gene identification				
CHARGE syndrome	WG tiling 1-Mb ^a & Chr.8 tiling (918 BACs)	5 Mb	• 1.23 Mb de novo overlapping del in two patients led to the discovery of CHD7 as the disease-causing gene	[60]
Peters Plus syndrome	WG 1-Mb ^a	1.5 Mb	A • 1.5 Mb del on 13q12.3q13.1 in two affected brothers. Several genes sequenced and mutation found in B3GALT1	[61]
Goltz syndrome (FDH)	244 K Agilent, targeted tiling NimbleGen	219 kb; 80 kb	Two teams detected deletions in Xp11.23 in four patients and sequencing of candidate genes identified PORCN as the gene mutated in FDH	[62,63]
STAR syndrome	244 K Agilent (• 12 kb ^a) and customized 105 K Agilent enriched for Xq28	37.9–50.7 kb	A del. at Xq28 in one patient removed exons 1 & 2 of FAM58A. Heterozygous point mutations found in other cases	[64]
EIEE	WG (4219 BACs)-0.7 Mb ^a	2 Mb	A del at 9q33.3–q34.11 detected in one affected girl. STXBP1 mutations were found in other affected individuals	[65]

Tabela 2 – Algumas alterações genômicas associadas à DI.

Name	Size (Mb) ^a	LCR	MIM	Clinical features
<i>1q21.1 microdeletion</i>	1.1	+	612474	Mild-to-moderate MR, MC, cardiac abnormalities, cataracts, clear incomplete penetrance.
<i>1q21.1 microduplication</i>	1.1	+	612475	Autism or autistic behaviours, mild to moderate MR, microcephaly, mild FD
<i>1q41q42 microdeletion</i>	1.2	-	-	MR, seizures, various dysmorphisms, cleft palate, diaphragmatic hernia
<i>2p15q16.1 microdeletion</i>	3.9	-	-	MR, MC, receding forehead, ptosis, telecanthus, short palpebral fissures, downslanting palpebral fissures, broad/high nasal bridge, long/straight eyelashes, smooth and long philtrum, smooth upper vermilion border, everted lower lip, high narrow palate, hydronephrosis, optic nerve hypoplasia
<i>3q29 microdeletion</i>	1.6	+	609425	MR, mild FD, including high nasal bridge and short philtrum
<i>3q29 microduplication</i>	1.6	+	611936	Mild/moderate MR, MC, obesity
<i>7q11.23 microduplication</i>	1.5	+	609757	MR, speech and language delay, autism spectrum disorders, mild FD
<i>9q22.3 microdeletion</i>	6.5	-	-	MR, hyperactivity, overgrowth, trigonocephaly, macrocephaly, FD
<i>12q14 microdeletion</i>	3.4	-	-	Mild MR, failure to thrive, proportionate short stature and osteopoiikilosis
<i>14q11.2 microdeletion</i>	0.4	-	-	MR, widely spaced eyes, short nose with flat nasal bridge, long philtrum, Cupid's bow of the upper lip, full lower lip, auricular anomalies
<i>15q13.3 microdeletion</i>	1.5	+	612001	MR, epilepsy, hypotonia, short stature, microcephaly and cardiac defects
<i>15q24 microdeletion</i>	1.7	+	-	MR, growth retardation, MC, digital abnormalities, genital abnormalities, hypospadias, loose connective tissue, high frontal hairline, broad medial eyebrows, downslanted palpebral fissures, long philtrum
<i>16p11.2 microdeletion/duplication</i>	0.6	+	611913	Association with MR, autism, schizophrenia
<i>16p11.2p12.2 microdeletion</i>	7.1	+	-	MR, flat facies, downslanting palpebral fissures, low-set and malformed ears, eye anomalies, orofacial clefting, heart defects, frequent ear infections, short stature, minor hand and foot anomalies, feeding difficulties, hypotonia
<i>16p13.1 microduplication</i>	1.6	+	-	Association with autism, significance uncertain
<i>16p13.1 microdeletion</i>	1.6	+	-	MR, MC, epilepsy, short stature, phenotypic variability
<i>17p11.2 microduplication^b</i>	3.7	+	610883	MR, infantile hypotonia, failure to thrive, autistic features, sleep apnoea, and structural cardiovascular anomalies
<i>17q21.31 microdeletion</i>	0.5	+	610443	MR, hypotonia, long hypotonic face with ptosis, large and low-set ears, tubular or pear-shaped nose with bulbous nasal tip, long columella with hypoplastic alae nasi, broad chin
<i>19q13.11 microdeletion</i>	0.7	-	-	MR, pre- and postnatal growth retardation, primary microcephaly, hypospadias, ectodermal dysplasia including scalp aplasia, dysplastic nails and dry skin
<i>22q11.2 microduplication</i>	3.7	+	608363	Highly variable. MR, FD, e.g. widely spaced eyes and downslanting palpebral fissures, velopharyngeal insufficiency, conotruncal heart disease
<i>22q11.2 distal microdeletion</i>	1.4 - 2.1	+	611867	MR, prematurity, prenatal/postnatal growth delay, mild skeletal abnormalities, arched eyebrows, deep-set eyes, smooth philtrum, thin upper lip, hypoplastic alae nasi, small pointed chin
<i>Xq28 microduplication</i>	0.4 - 0.8	-	-	MR, severe hypotonia, progressive lower-limb spasticity, absent or very limited speech

FONTE: Vissers et al. (2010).

2.2. Métodos de detecção de rearranjos submicroscópicos

O advento de novas técnicas moleculares facilitou o rastreamento de regiões genômicas relacionadas ao desenvolvimento das malformações e ADNPM. A busca por novas mutações alcançou novos níveis por meio da análise de sequências de genes candidatos expressos no cérebro (Jensen et al., 2006) e da análise de todos os genes do cromossomo X (Raymond; Tarpey, 2006).

Outras abordagens incluem análise de rearranjos submicroscópicos avaliados por meio das técnicas de FISH, MLPA e de *array*-CGH (Figura 1).

Desde o início da utilização de métodos moleculares, a técnica de FISH foi útil na detecção de diversas regiões deletadas ou duplicadas. Sondas de DNA para a região crítica da síndrome de Di George (DGS) e/ou da síndrome velocardiofacial (VCFS) mostraram que uma grande porcentagem dos

pacientes com o espectro clínico de ambas apresentam deleções em 22q (Nogueira et al., 2008).

Já a técnica de MLPA foi desenhada de forma a permitir a detecção de anormalidades genéticas como aneuploidias, deleções e duplicações em um único ensaio (Schouten et al., 2002), e também é bastante utilizada para a avaliação do número de cópias da região 22q11.2 e a identificação de alterações em vários *loci* simultaneamente (Figura 1).

Uma técnica mais recentemente desenvolvida, a técnica de CGH-*array* tem permitido a detecção de microaberrações genômicas com um alto nível de resolução sendo este de cerca de 100 Kb a teoricamente 6 Kb (de Ravel et al., 2007; Toruner et al., 2007) (Figura 1).

A reavaliação da correlação cariótipo-fenótipo utilizando CGH-*array* em pacientes portadores de deleção de 18q estreitou algumas regiões relacionadas a características clínicas específicas, como para a microcefalia em 18q21.33, além de aumentar a capacidade de detecção de alterações genômicas crípticas concomitantes que puderam, em parte, explicar a disparidade dos pontos quebra descritos na literatura em relação ao fenótipo clínico (Feenstra et al., 2007).

O *array* oferece muitas vantagens quando comparado a outros métodos de análise do genoma porque não exige células em divisão e nem cariotipagem prévia. Permite uma análise global rápida, comparável à realização de centenas de hibridações *in situ* por fluorescência, além de apresentar alta capacidade de detecção de microrrearranjos genômicos que podem, em parte, elucidar a etiologia de diferentes fenótipos clínicos (Shaffer; Bui, 2007).

Figura 1. A evolução das técnicas citogenômicas (gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Leslie Domenici Kulikowski).

O desenvolvimento de plataformas cada vez mais robustas, com maior resolução, já possibilita a detecção de cerca de 99% das anormalidades cromossômicas desbalanceadas, em um único experimento, como ilustrado no Quadro 1 (Piazzon; Dias, 2013).

Quadro 01 – Frequência de detecção de anormalidades cromossômicas entre os diferentes testes de triagem.

Testes de triagem genômica quantitativa	Deteção de anormalidades cromossômicas (em %)
Cariotipagem	3 – 15
MLPA	55 – 72,5
WGAS	~ 99

De acordo com as diretrizes propostas pelo Colégio Americano de Patologistas, o *array* deve ser utilizado como primeira escolha para triagem de alterações genômicas em indivíduos portadores de defeitos congênitos, ADNPM ou DI (Shaffer, 2005). Esta realidade é vivenciada por países com Estados Unidos e Canadá. Entretanto, os custos para a realização desta

técnica diagnóstica ainda são muito elevados para países em desenvolvimento como o Brasil, recomendando-se a sua utilização em casos específicos.

Assim sendo, as técnicas de MLPA e FISH representam uma alternativa de bom custo-benefício para a triagem genômica e definição de alterações submicroscópicas não visualizadas pela técnica de cariotipagem.

Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza a seus usuários o exame de cariótipo com Bandas G em sangue periférico. Entretanto, este não é acessível à toda população por existir grande demanda de casos e falta de centros diagnósticos que disponibilizem essa técnica em algumas regiões do país. Durante décadas, a cariotipagem foi a única ferramenta disponível para investigar a etiologia cromossômica na prática da Genética Médica. Apesar de sua importância inquestionável na elucidação de grandes rearranjos complexos, aneuploidias clássicas e rearranjos equilibrados com pouco recurso financeiro, devido às suas limitações técnicas, não detecta alterações menores que 5 Mb. Cerca de 3 - 7% dos portadores de deficiência intelectual idiopática apresentam pequenas alterações nas regiões subteloméricas, sendo que o cariótipo diagnóstica, aproximadamente, 10% desses casos e, 50% permanecem sem diagnóstico (Stankiewicz; Beaudet, 2007).

A experiência do Laboratório de Citogenômica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo revela que, no ano de 2011, 25% dos pacientes com alterações fenotípicas e cariótipo normal apresentavam variação no número de cópias gênicas detectadas pela técnica de MLPA.

A introdução do cariótipo molecular à prática da genética clínica traz uma série de questionamentos aos geneticistas, com relação à indicação e aplicabilidade do teste, interpretação de resultados duvidosos e implicações éticas de fornecer informações encontradas incidentalmente, mas que podem trazer comprometimentos futuros ao paciente e, não foram o motivo da solicitação do teste (Bruno et al., 2011).

2.3. Desafio na análise do número de cópias gênicas

A utilização de plataformas de *array* de alta resolução demonstrou que aproximadamente 20% dos rearranjos cromossômicos não balanceados são

menores que 1 Mb. A utilização destas novas plataformas de alta resolução permitiu a identificação de alterações no número de cópias de até 1 a 2 kb e, dessa forma, microrrearranjos ou alterações em um único gene puderam ser elucidados. Entretanto, o excesso de informação detalhando o genoma do paciente dificulta a distinção entre as CNVs patogênicas e benignas. Para tanto, a avaliação do geneticista clínico é fundamental para a realização da correlação genótipo-fenótipo de maneira inequívoca. Um exemplo desse desafio é a interpretação das CNVs de significado clínico incerto. Para isso, são usadas bases de dados públicas como a do ISCA (*International Standard for Cytogenomic Arrays Consortium*, <https://www.iscaconsortium.org>) e o DGV (*Data of Genomic Variants*, <http://projects.tcag.ca/variation>) para identificação das CNVs benignas (Bruno et al., 2011).

A identificação precisa das alterações citogenômicas que explicam o quadro clínico do paciente com doença genética tem como objetivo, em primeiro plano, a elucidação diagnóstica com consequente diminuição da ansiedade das famílias, acabando por cessar a “peregrinação pelo diagnóstico de uma entidade rara” (Bruno et al., 2011). Ainda possibilita a prevenção de comorbidades, uma vez que, se estabelece exatamente quais os genes envolvidos no desequilíbrio genômico, e, em alguns casos, pode-se prevenir consequências mais sérias do comprometimento de múltiplos sistemas. Como conclusão final desse trabalho árduo de interpretação clínica dos dados citogenômicos, realiza-se o aconselhamento genético apurado para as famílias, estabelecendo-se riscos de recorrência verdadeiros para a prole e não mais estimados, o que ocasiona impacto até mesmo na saúde pública (Vermeesch et al., 2005).

A escassez de centros especializados nas técnicas de citogenômica e o custo das mesmas são os principais motivos que tornam o acesso a essas tecnologias limitado no SUS, enquanto a falta de cobertura para esses testes pelos planos de saúde é o limitante na saúde suplementar.

Portanto, a combinação dos exames de cariótipo, MLPA e FISH parece ser a forma mais eficiente e com custos aceitáveis para se investigar a etiologia das doenças genômicas na realidade brasileira.

2.4. A realidade da Genética Médica no Brasil

Figura 2. Além da banda G: *iceberg* ilustrando a dificuldade na elucidação de casos citogenômicos complexos (FONTE: Piazzon; Dias, 2013).

A maioria dos serviços de Genética Médica ainda atua na superfície, só enxergando a ponta do *iceberg*, mas com o avanço da análise de alta resolução do genoma é possível aprofundar no genoma do paciente, conhecendo a parte submersa do *iceberg*. Assim, a Genética Médica transforma-se em uma especialidade emergente e indispensável, que evoluiu da clínica-observacional para uma interface clínico-laboratorial sofisticada, capaz de realizar diagnósticos e aconselhamentos acurados e, em breve, futuro tratamentos personalizados (Piazzon; Dias, 2013).

A dificuldade da análise inequívoca desses resultados evidencia a necessidade imediata da Genética Médica assimilar e incorporar novos conhecimentos à sua prática. A triagem genômica utilizando a cariotipagem molecular (FISH, MLPA e *array*) já é recomendada na literatura médica e, portanto, um desafio que todo geneticista precisa enfrentar (Shaffer, 2005).

O aumento da resolução das plataformas de *array* possibilita o detalhamento das alterações genômicas a tal nível, que foi possível encontrar segmentos de DNA com número de cópias gênicas normal, intercalados a duplicações e triplicações gênicas, ilustrando o fenômeno da *chromothripsis*, também conhecida como catástrofe cromossômica, que pode ser associado a diferentes fenótipos clínicos, antes inexplicados.

No Brasil, a implantação desses métodos ainda não é realidade, resultando em volume considerável de casos indefinidos, onerando o SUS e a sociedade.

A discussão de novas diretrizes clínicas e laboratoriais, um dos objetivos deste trabalho, bem como a adoção da investigação citogenômica para o atendimento adequado dos pacientes é um caminho irreversível para a Medicina atual.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar pacientes com ADNPM associado à MC sem diagnóstico conclusivo.

3.2. Específicos

- Caracterizar a presença de alterações genômicas utilizando as técnicas de MLPA e *array*;
- Determinar molecularmente o tamanho dos segmentos deletados e/ou duplicados envolvidos nas alterações genômicas;
- Descrever o fenótipo clínico dos pacientes com alterações genômicas detectadas;
- Estudar a correlação genótipo-fenótipo.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

A amostra do presente trabalho foi obtida por meio da análise dos resultados de 71 pacientes que apresentavam ADNPM e/ou MC, com cariótipo prévio em bandamento G com resultado normal conforme mostra a Figura 3.

O projeto foi aprovado pela CAPPesq, sob o número 0371/10. Foram incluídos apenas os pacientes cujos genitores ou responsáveis autorizaram a realização da pesquisa, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos A e B).

Este estudo apresentou apoio financeiro dos seguintes projetos: CNPq (Edital MCT/CNPq/CT – SAÚDE nº 57/2010 – Processo nº 401910/2010-5) e FAPESP (Edital PPSUS – Processo nº 2009-53105-09), sendo realizado parte no Laboratório de Genômica Pediátrica (LIM 36), parte no Laboratório de Citogenômica (LIM 03) do HC-FMUSP e alguns experimentos de *array* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba-SP. A seleção dos pacientes foi baseada nos seguintes critérios:

Para inclusão: foram considerados pacientes com ADNPM que não acompanharam o início do desenvolvimento para idade pela escala de Denver II. Esses pacientes classificados com ADNPM tinham que ter ao menos uma malformação maior ou mais de duas malformações menores também consideradas dismorfias (Jones, 2006). Exemplos de dismorfias: orelhas de baixa implantação, hipertelorismo ocular, hipertelorismo mamário, íris estrelada, coloboma de íris ou pupila. Malformações maiores: cardiopatia congênita, agenesia de corpo caloso, malformação renal, etc. Os pacientes incluídos tinham cariótipo com bandas G, realizado em diferentes serviços, normal ou sem alterações que justificassem o quadro clínico (Figura 3).

Para exclusão: cariótipo com bandas G anormal e conclusivo, ausência de ADNPM ou DI quando pertinente, ausência de MC ou dismorfias associadas (Figura 3).

O exame físico dos pacientes foi realizado por médicos geneticistas da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HC-FMUSP) e/ou

médico geneticista do Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar.

Figura 3. Critérios de inclusão e exclusão na casuística deste estudo.

Uma amostra de sangue periférico dos genitores também foi coletada quando disponível, para ser utilizada posteriormente na análise de regiões polimórficas se necessário. Após conclusão da análise das técnicas, foi emitido laudo de MLPA (vide figura 4 para entender o fluxo do trabalho) e *array* para todos os 71 pacientes (Anexos C, D e E).

Figura 4. Fluxo do trabalho

4.2. Técnicas utilizadas

4.2.1. Isolamento e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostra de 1 a 5mL de sangue periférico do paciente, utilizando como anticoagulante o ácido

etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O material genético foi extraído por meio do *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)* (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo o protocolo do fabricante com algumas modificações. A concentração e qualidade das amostras de DNA foram determinadas por espectrofotômetro (*NanoVue - GE Healthcare Life Sciences*) e as alíquotas de DNA foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

4.2.2. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

A técnica de MLPA permite a quantificação relativa do número de cópias de aproximadamente 50 sequências do genoma em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em diversos genes (Stuppia et al., 2012; Willis et al., 2012). As reações de MLPA foram realizadas segundo orientações do fabricante, porém com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes (Dutra et al., 2012).

Para a investigação do DNA de cada paciente foram utilizados no mínimo três *kits* combinados, entre eles, o *SALSA MLPA probemix P036-E1 Human Telomere-3* e o *SALSA MLPA probemix P070-B2 Human Telomere-5*, que investigam alterações em todos os subtelômeros humanos e o *SALSA MLPA probemix P064-B3 Mental Retardation-1*, que investiga as principais síndromes de microdeleção e microduplicação como: da deleção 1p36, Wolf-Hirschhorn, Cri du Chat, Williams-Beuren, Prader-Willi / Angelman, Sotos, Langer-Giedion, Rubinstein-Taybi, deleção 22q11 entre outras.

Outros *kits* para regiões específicas foram utilizados. Em alguns casos, para caracterizar pontos de quebra genômicos conforme necessário.

Os dados gerados foram analisados por meio do software *GeneMarker* (*Softgenetics*, LLC, State College, PA, USA – www.softgenetics.com).

4.2.3. Técnica de triagem genômica por array

As tecnologias de *array* disponíveis comercialmente detectam pequenos desequilíbrios genômicos no genoma completo simultaneamente e, além disso, delimitam os pontos de quebra dessas alterações.

Utilizamos três plataformas diferentes, conforme a disponibilidade do laboratório e, em todos os casos, a amplificação do DNA, marcação, hibridação

e lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo de cada fabricante. Abaixo seguem as plataformas utilizadas neste estudo:

➤ **Plataforma Agilent**

O array por hibridação genômica comparativa (CGH-array) da Agilent foi realizado em lâminas contendo sondas de 60-mer de oligonucleotídeos utilizando o *Human Genome CGH Microarray 2x105K* ou o *SurePrint G3 Human Microarray 4x180 K* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A lâmina de 105 K possui aproximadamente 105.750 sondas com um espaçamento médio de sondas de 22 Kb, e a de 180 K um total de 180.880 sondas, com um espaçamento médio de 17 Kb. Como controle foi utilizado DNA genômico masculino (*Human male genomic DNA*, Promega Corporation, Madison, USA) disponível comercialmente. A leitura das lâminas foi realizada pelo equipamento *SureScan Microarray Scanner* da Agilent e os dados foram analisados pelo programa *Feature Extraction v10.5*. O total de 3 mg de DNA do paciente e 3 mg de DNA genômico controle foram digeridos com as enzimas AluI (5 unidades) e RsaI (5 unidades) (Promega) por um mínimo de 2 horas à 37°C. Foram retiradas amostras para uma análise comparativa em gel, do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão.

➤ **Plataforma Affymetrix**

Os chips são fabricados utilizando a síntese *in situ* de curtas sequências de oligonucleotídeos de 25-mer. Utilizamos o *chip CytoScan HD*, que possui cerca de 2.696.550 sondas de CNVs e 749.157 de SNPs, com uma cobertura média de sonda de 1,1 Kb; e o *Genome-Wide Human SNP array 6.0*, com mais de 1,8 milhão de sondas, incluindo 906.600 sondas de SNPs e cerca de 946.000 sondas para a detecção de CNVs e um espaçamento médio de sondas de 1-5 Kb (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Esta plataforma permite uma maior acurácia do ponto de quebra das alterações, além de determinação de regiões com perda de heterozigosidade (LOH), detecção de dissomia uniparental (UPD) e baixo nível de mosaicismo.

➤ **Plataforma Illumina®**

O *HumanCytoSNP-12 BeadChip* (Illumina Inc., San Diego, CA) compreende um painel de triagem do genoma com sondas ligadas a *beads* magnéticas, que estão distribuídas aleatoriamente em toda a lâmina. Este array

inclui cerca de 300.000 sondas de SNPs de 50-mer que cobrem todo o genoma e sondas alvo para todas as regiões de importância citogenética conhecidas, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e dos cromossomos sexuais.

As lâminas do *array* foram escaneadas no *iScan Reader* e a análise dos dados foi realizada utilizando os softwares da *Illumina GenomeStudio* versão 2010.1 e *KaryoStudio* versão 1.4.3.0 *Build 37 (CNV Plugin V3.0.7.0)*.

Nesta plataforma é possível detectar anormalidades genômicas incluindo duplicações, deleções, regiões com LOH, UPD e mosaicismo.

Todas as lâminas que foram utilizadas, mesmo com diferentes resoluções, apresentam a cobertura mínima necessária para serem empregadas na triagem genômica de rotina.

4.2.4. Análise de dados

Os dados brutos obtidos da análise genômica pela técnica de *array* em diferentes plataformas foram submetidos à análise utilizando os seguintes bancos de dados:

- *Database of Genomic Variants* (DGV, disponível em: <http://projects.tcag.ca/variation/>),
- *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER, disponível em: <http://decipher.sanger.ac.uk/>)
- *UCSC Genome Bioinformatics* (disponível em: <http://genome.ucsc.edu>).

Essa consulta aos bancos de dados foi realizada para classificação das CNVs encontradas em benignas, patogênicas ou VOUS.

Foram consideradas CNVs benignas as alterações genômicas observadas em amostra de indivíduos normais, catalogadas no banco de dados DGV e assim, classificadas como polimórficas. Foram consideradas CNVs patogênicas as alterações genômicas relatadas que englobavam genes associados ao fenótipo clínico observado.

E foram consideradas VOUS as alterações genômicas que não envolviam genes conhecidos, que poderiam ou não estar relacionados às

alterações clínicas observadas. Quando disponíveis, as amostras dos pais foram então avaliadas na tentativa de auxiliar a classificação das alterações encontradas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Participaram deste trabalho 71 pacientes que apresentavam ADNPM associado à MC com cariótipo prévio não-conclusivo conforme fluxograma ilustrado na Figura 4.

Para um único paciente do estudo (G-5) foi necessária a realização da cariotipagem em bandamento G para o esclarecimento da alteração genômica encontrada após a triagem inicial por MLPA. O estudo citogenômico completo deste paciente está descrito no artigo Dutra et al., 2015.

Para a análise das alterações genômicas foram aplicadas as técnicas de MLPA com os *kits* P036, P070 e P064 combinados e, subsequentemente, a técnica de WGAS com diferentes plataformas, conforme descrito anteriormente.

Figura 5. Fluxograma e classificação dos resultados de *array*. “CNVs” significa variações no número de cópias gênicas; “VOUS” é toda variante de significado clínico incerto; “ausentes” significa que não há alteração no número de cópias (pacientes que tiveram resultado de *array* normal); “DUP/DEL” significa duplicação e deleção em um mesmo paciente.

Entre os 33 pacientes com alterações patogênicas e com alterações de significado clínico incerto (VOUS), encontramos: 12 pacientes com deleção, 5 com duplicação e 16 com duplicação e deleção (dup/del) concomitantes.

Foram 29 pacientes com alterações patogênicas conclusivas, 4 pacientes com CNVs classificados como VOUS, sendo que destes, 16 pacientes apresentaram 2 ou mais CNVs alterados. Quinze pacientes tiveram resultado de *array* normal e outros 23 apresentaram alterações benignas, ou por não apresentarem genes na região alterada, ou por serem genes sem fenótipos descritos ou ainda, as alterações foram herdadas de genitores normais. Destes, foram encontrados 4 pacientes com regiões de perda de heterozigosidade.

Segue a Tabela 3 com todos os pacientes do estudo e o resultado das 2 técnicas utilizadas MLPA – *array* e a alteração genômica encontrada.

PACIENTE	PACIENTE	MLPA	ARRAY		CLASSIFICAÇÃO
		ALTERAÇÃO	ALTERAÇÃO / TAMANHO	COORDENADAS	
G-75	01	Normal	del 19p13.12 (39,4 kb)	14,729,069 - 14,768,462	Benigna
G-321	02	del 22q11.21 atípica	del 22q11.21 (537,4 kb) mat	21,034,808 - 21,572,202	Patogênica
P-8	03	del 9p dup 20p	del 9p24.3p22.2 (17,6 Mb) dup 20p13p12.1 (14,8 Mb)	116,890 - 17,629,981 8159 - 14,755,396	Patogênica
P-9	04	-	del 15q26qter (8,1 Mb)	92,206,075 - 100,338,914	Patogênica
G-311	05	Normal	del 17p11.2 (14 kb)	17,622,000 - 17,638,500	Patogênica
13B	06	Normal / Inconclusivo	dup 22q11.21 (163,5 kb)	18,844,632 - 19,008,108	Benigna
06B	07	Normal	dup 18q22.2→q22.3 (665,4 kb)	68,090,674 - 68,756,043	VOUS
18B	08	dup 22q11.21 atípica (PRODH)	dup 22q11.21 (130,3 kb)	18,877,787 - 19,008,108	Benigna
20B	09	Normal	del 8p22 (125,9 kb)	16,399,163 - 16,525,028	Benigna
G-317	10	Normal	dup Xq22.2 (192,5 kb)	103,111,457 - 103,303,968	Benigna
G-237	11	Normal	del 1q21.1→q21.2 (1,3 Mb)	146,512,899 - 147,826,658	Patogênica
G-332	12	Normal	dup 12q13.11 (137,6 kb)	47,608,167 - 47,745,802	Benigna
G-344	13	Normal	del 8p23.2 (255,6 kb)	4,815,661 - 5,071,270	Benigna
G-353	14	Normal / Inconclusivo	del 16p11.2 (394,9 kb)	32,257,633 - 32,652,546	Benigna
G-497	15	Normal	del 6q25.2→q27 (11,9 Mb)	153,258,023 - 165,115,007	Patogênica
G-451	16	Normal / Inconclusivo	dup 22q13.31 (340,1 kb)	47,335,208 - 47,675,283	Benigna
G-606	17	Normal / Inconclusivo	dup 22q11.22 (247,5 kb)	22,314,463 - 22,561,973	Benigna
G-101	18	del 22q11.21 típica	del 22q11.21 (2,6 Mb)	18,877,787 - 21,462,353	Patogênica
G-19	19	Normal	dup 7p22.2 (149,6 kb)	4,024,024 - 4,173,613	Benigna
G-83	20	dup 7q11.23 (EZD9) atípica	del 18p11.21 (273,6 kb)	14,550,022 - 14,823,578	Benigna
G-359	21	Normal	del 6q24.3→q25.1 (849,6 kb)	148,971,363 - 149,820,948	Patogênica
G-241	22	Normal	del 17q23.3 (30 kb)	61,947,000 - 61,977,500	Benigna
			del Xq22.1 (1 kb)	99,904,100 - 99,905,800	
01B	23	Normal	del 2p11.2 (219,9 kb)	90,027,810 - 90,247,720	Benigna
			dup 8p23.2 (221,1 kb)	2,360,883 - 2,581,969	
07B	24	del 7q36.3	dup 7q36.3 (161,3 kb)	158,752,863 - 158,914,170	VOUS
			dup 11q24.2 (170,0 kb)	126,501,321 - 126,671,287	
08B	25	del 4p16.3	del 4p16.3→p16.1 (6,4 Mb)	48,283 - 6,471,246	Patogênica
			dup 16p13.11 (1,1 Mb)	15,126,890 - 16,229,207	
12B	26	Normal	del 16p12.2 (141,1 kb)	21,599,125 - 21,740,231	Patogênica Benigna
			del Yq11.223 (480,8 kb)	24,392,881 - 24,873,665	
19B	27	del 7q11.23 típica	del 7q11.23 (1,4 Mb)	72,722,981 - 74,138,121	Patogênica
			4 regiões – LOH	-	LOH
14B	28	Normal	del 3p13→p12.1 (11,5 Mb)	74,143,047 - 85,618,308	Patogênica
			del 7p21.1→p15.3 (878,6 kb)	20,703,948 - 21,582,516	Patogênica
G-191	29	Normal	del 22q13.2 (598,2 kb)	41,042,091 - 41,640,297	Patogênica
			dup 8p22 (102,9 kb)	13,847,960 - 13,950,829	Benigna
G-217	30	Normal	del 8q24.23 (119,7 kb)	137,730,280 - 137,850,011	Benigna
			dup 12p11.21 (132,1 kb)	31,269,300 - 31,401,378	
819 / G-866	31	Normal	del 8p23.2→p23.1 (128,3 kb)	6,119,926 - 6,248,244	Benigna
			dup 10q11.21 (139,5 kb)	45,212,898 - 45,352,419	
1025 / G-1518	32	Normal	dup Xp22.31→p22.2 (216,3 kb)	9,341,848 - 9,558,115	Benigna
			dup Xp22.2 (556,8 kb)	11,059,287 - 11,616,086	
G-593	33	Normal	dup 15q26.3 (305,0 kb)	100,293,750 - 100,598,777	Benigna
			10 regiões – LOH	-	LOH
G-15	34	del 4q35.2	del 4q32.1→q35.2 (29,3 Mb)	161,623,467 - 190,880,409	Patogênica
			dup 5p15.2 (378,8 kb)	13,798,819 - 14,177,667	
G-110	35	Normal	del 2p11.2 (219,9 kb)	90,027,810 - 90,247,720	Benigna
			del Yp11.2 (275,9 kb)	9,645,003 - 9,920,943	
G-67	36	dup 5q35.3 típica del 2q37.3 dup 5q35.3	del 2q37.3 (3,5 Mb)	239,550,182 - 243,029,573	Patogênica
			dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb)	172,194,873 - 180,705,539	
G-450	37	Normal	dup 22q13.31 (344,9 kb)	47,330,328 - 47,675,283	Benigna
			dup 10q11.22 (686,4 kb) DGV	47,073,657 - 47,760,066	Benigna
G-524	38	Normal	dup 22q11.23→q12.1 (199,2 kb)	25,711,667 - 25,910,879	Benigna
			del 9p23→p22.3 (1,1 Mb)	13,468,616 - 14,566,406	VOUS

PACIENTE	PACIENTE	MLPA	ARRAY		CLASSIFICAÇÃO
		ALTERAÇÃO	ALTERAÇÃO / TAMANHO	COORDENADAS	
G-615	39	dup 3q29 del 9p24.3	dup 3q26.31→q29 (23,4 Mb) del 9p24.3→p23 (11,5 Mb)	174,466,591 - 197,845,254 204,104 - 11,659,355	Patogênica
G-390	40	del 17p13.3 atípica dup 17q25.3	del 17p13.3 (2,2 Mb) dup 17q25.1→q25.3 (6,6 Mb)	148,092 - 2,310,571 74,307,023 - 80,943,189	Patogênica
G-157	41	Normal	del 2q33.1 (20 kb) del 3q28 (4 kb) 1 região – LOH	203,291,000 - 203,312,000 189,360,000 - 189,364,000 -	Benigna LOH
G-170	42	Normal	del 1q25.3 (93,2 kb) dup 3q22.1 (219,8 kb) del 9p21.1 (52,9 kb)	180,300,936 - 180,394,157 129,676,581 - 129,896,364 32,562,410 - 32,615,311	Benigna
G-6	43	Normal	dup 9p11.2 (2,5 Mb) del 9p11.2 (96,4 kb) sem genes dup 9p11.2 (858,3 kb)	41,692,304 - 44,244,868 44,727,846 - 44,824,251 44,864,687 - 45,723,022	Patogênica Benigna
G-169	44	del 1p36 atípica del 1p36.33	del 1p36.33→p36.32 (1,9 Mb) del 1p36.32 (973,6 kb) dup 1p36.32 (167,0 kb)	564,620 - 2,456,203 2,473,257 - 3,446,813 3,474,630 - 3,641,681	Patogênica
16B	45	Normal	del 8q24.23 (119,7 kb) del Yq11.21 (158,2 kb) dup Xp22.33 (898,2 kb)	137,730,280 - 137,850,011 14,136,291 - 14,294,504 1,635,520 - 2,533,704	Benigna VOUS
17B	46	Normal	del 8q24.23 (119,7 kb) dup 14q11.2 (211,1 kb) 8 regiões – LOH	137,730,280 - 137,850,011 20,213,937 - 20,425,051 -	Benigna LOH
G-242	47	Normal	dup 4q28.3 (362,0 kb) del 22q11.23→q12.1 (178,2 kb) dup Xq22.2 (124,8 kb)	131,880,992 - 132,242,986 25,732,697 - 25,910,879 103,179,170 - 103,303,968	Benigna Benigna
G-396	48	Normal	del Xp22.13→p22.12 (1,5 Mb) del 19q13.41 (91,9 kb) dup 15q11.2 (1,4 Mb)	18,179,714 - 19,719,264 53,078,641 - 53,170,558 21,165,558 - 22,562,318	Patogênica Benigna VOUS
G-291	49	Normal	dup 14q32.33 (999,3 kb) dup 7q11.23 (554,8 kb) del 5q12.1 (313,4 kb)	105,998,544 - 106,997,898 76,060,510 - 76,615,349 59,209,183 - 59,522,613	Patogênica Benigna Benigna
G-158	50	del 4q35.2 dup Xq28	del 4q35.1→q35.2 (5,1 Mb) dup Xq27.1→q28 (15,4 Mb) del 2p11.2 (219,9 kb)	185,821,036 - 190,880,409 139,513,770 - 154,929,412 90,027,810 - 90,247,720	Patogênica Benigna
G-239	51	dup 9p21.3 del 18q23	dup 9p24→p23 (13,0 Mb) del 15q11.2 (132,2 kb) del 18q22→q23 (7,3 Mb) dup Xp22.31 (286,7 kb)	46,587 - 13,044,407 24,352,956 - 24,485,160 70,661,919 - 78,014,582 7,828,792 - 8,115,453	Patogênica Benigna
G-68	52	dup 5q35.3 típica del 2q37.3 dup 5q35.3	del 2q37.3 (3,5 Mb) dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb) del 12p13.31 (136,7 kb) dup 18q12.1 (241,6 kb)	239,550,182 - 243,029,573 172,179,584 - 180,705,539 7,986,563 - 8,123,306 27,815,609 - 28,057,171	Patogênica Benigna
G-148	53	del 4p16.3 dup 8p23.3	del 4p16.3→p16.1 (9,3 Mb) dup 8p23.3→p23.1 (6,8 Mb) dup 12p13.31 (155,9 kb) dup 12p11.21 (169,2 kb)	48,283 - 9,370,908 176,818 - 6,974,050 8,023,943 - 8,179,891 31,240,334 - 31,409,579	Patogênica Benigna
965 / G-1517	54	dup 2p25.3 del 4q35.2 del 4q35 (KLKB1)	dup 2p25.3→p24.3 (14,8 Mb) del 4q35.1→q35.2 (4,4 Mb) del 15q11.1→q11.2 (1,9 Mb) dup 22q11.23→q12.1 (244,9 kb)	72,184 - 14,856,914 186,469,493 - 190,880,409 20,482,360 - 22,421,358 25,665,985 - 25,910,879	Patogênica Benigna

PACIENTE	PACIENTE	MLPA	ARRAY		CLASSIFICAÇÃO
		ALTERAÇÃO	ALTERAÇÃO / TAMANHO	COORDENADAS	
G-5	55	del 7q11.23 atípica dup Yp11.32 dup Yq12	del 7q11.23 (115 kb)	72,569,012 - 72,685,658	Patogênica
			del 7q11.23 (1,2 Mb)	73,082,174 - 74,267,872	
			del 7q11.23 (330 kb)	74,298,092 - 74,601,104	
			dup Xp22.33 (2,5 Mb)	192,991 - 2,693,037	
			dup Yp11.31→q11.23 (25 Mb)	INTEIRO	
			dup 7p14.3 (60 kb)	33,134,410 - 33,169,152	
			del 13q31.3 (58 kb)	94,415,000 - 94,470,000	Benigna
818 / G-928	56	del 16p.13.3	dup 16q24.1→q24.3 (4,3 Mb)	85,817,324 - 90,148,796	Patogênica
			dup 14q11.2 (211,1 kb)	20,213,937 - 20,425,051	Benigna
			del 16p13.3 (91,2 kb)	105,320 - 196,497	
			dup 22q11.22 (247,3 kb)	22,302,762 - 22,550,078	Benigna
			dup 1p32.3 (169,6 kb)	55,103,945 - 55,273,580	
			del 16p13.3 (613,1 kb)	215,379 - 828,466	
			dup Xq22.2 (130,9 kb)	103,173,049 - 103,303,968	
10B	57		Sem alteração	-	-
11B	58		Sem alteração	-	-
15B	59		Sem alteração	-	-
G-393	60		Sem alteração	-	-
G-458	61		Sem alteração	-	-
G-402	62		Sem alteração	-	-
G-530	63		Sem alteração	-	-
G-403	64		Sem alteração	-	-
G-416	65		Sem alteração	-	-
G-87	66		Sem alteração	-	-
G-88	67		Sem alteração	-	-
G-86	68		Sem alteração	-	-
G-634	69		Sem alteração	-	-
G-441	70		Sem alteração	-	-
G-685	71		Sem alteração	-	-

Tabela 3 – Resultados obtidos pelas técnicas citogenômicas dos 71 pacientes.

5.1. Análise dos resultados

Após a análise, os pacientes foram classificados em três grupos distintos de acordo com os resultados encontrados:

Grupo 1 – Alterações genômicas patogênicas;

Grupo 2 – Alterações genômicas de significado clínico incerto (VOUS);

Grupo 3 – Alterações genômicas benignas.

Figura 6. Fácies dos pacientes e linfedema do paciente 56 com CNVs patogênicos.

Figura 7. Fácies dos pacientes com CNVs benignos. P13 foi posteriormente diagnosticada com a síndrome do X frágil.

_____ ***DISCUSSÃO***

6. DISCUSSÃO

Grupo 1 – Alterações genômicas patogênicas: neste grupo foram incluídos os pacientes em que as alterações do número de cópias geralmente eram maiores que 200kb em regiões que envolviam genes responsáveis por fenótipos ou menores que 200kb, mas em regiões críticas de síndromes de microdeleção/ microduplicação ou ainda sobre o segmento de um gene importante para causar fenótipo pela sua haploinsuficiência; no entanto, o ponto comum em todos esses casos, é que as alterações encontradas explicavam a clínica dos pacientes, ou seja, foram os casos conclusivos que tiveram seu diagnóstico estabelecido como consequência deste trabalho. Foram 29 pacientes neste grupo com diagnóstico genético e 10 destes obtiveram a conclusão de seu aconselhamento genético à medida que a investigação dos genitores foi possível. Alguns exemplos deste grupo seguem bem detalhados abaixo:

- **Paciente 2 (G-321):** sexo feminino, 15 anos, ADNPM, transtorno do espectro autista, obesidade relacionada à compulsão alimentar sem melhora com sibutramina, agitação, em uso de diversas medicações antipsicóticas, indutores de sono e ansiolíticos por alteração psiquiátrica que a mãe também apresenta. Ao exame físico: estatura < p5 - percentil 5 (baixa estatura), peso > p95 - percentil 95 (obesidade), PC 57 cm (no limite superior da normalidade), sem dismorfias faciais típicas, sem cardiopatia. Possui BERA e RNM crânio normais. Foi então realizado o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* que revelou o seguinte resultado: arr[hg19]22q11.21(21,034,808-21,572,202)x1. Detectou-se a perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 538 kb, localizada no braço longo do cromossomo 22, região 22q11.21, que envolve 26 genes com fenótipo reconhecido, entre eles os genes da região crítica distal LCR22C-D da síndrome de Di George, *SERPIND1*, *SNAP29*, *CRKL*, *LZTR1* e não inclui o gene *TBX1* (McDonald-McGinn et al., 2015; Hacıhamdioğlu et al., 2015). Este resultado é compatível com o diagnóstico da síndrome de deleção atípica do cromossomo 22 e foi confirmado por MLPA e pesquisado nos genitores, mostrando que a deleção foi

herdada da mãe que também tem sintomas psiquiátricos. Conclui-se, então, o aconselhamento genético como de alto risco de recorrência (50%) para a irmandade.

- **Paciente 55 (G-5):** sexo masculino, 4 anos e 6 meses na primeira avaliação para investigação de ADNPM, dificuldade de aprendizado na escola e alteração de comportamento com oscilação entre o sociável e o agressivo. Fácies típica da síndrome de Williams-Beuren (SWB), sem cardiopatia e sem baixa estatura comuns na síndrome. Realizado o MLPA que confirmou a SWB, mas revelou um duplo Y (Figura 7A) que foi confirmado pelo cariótipo em banda G com o resultado 47,XY,Y; posteriormente o *array* (*Affymetrix CytoScan HD array*) revelou alterações genômicas complexas no cromossomo 7 (7p14.3 e 7q11.23). O paciente apresenta uma deleção atípica (1,2 Mb) entre duas sequências normais (Nml), seguida de sequências deletadas (del) na região 7q11.23 (Figura 7B). O *array* também revelou alterações genômicas benignas como a duplicação de 7p14.3 e a deleção em 13q31.3 (Figura 7C), além das alterações nos cromossomo X (Figura 7D) e Y. O cariótipo paterno foi realizado e revelou-se normal, 46,XY. Foram realizados os *arrays* dos genitores (*HumanCytoSNP-12 BeadChip*) que mostraram que nenhuma das alterações do paciente foi herdada. O caso deste paciente foi considerado *de novo* com baixo risco de recorrência para a família após a conclusão do estudo citogenômico nos genitores normais conforme Dutra et al. (2015).

A

Figura 8: (A) Cariótipo com bandas G e MLPA ilustrando os achados da SWB e duplo Y. (B, C, D) Ilustram as alterações genômicas encontradas nos cromossomos 7, 13, X e Y no *array* de P55.

- **Paciente 44 (G-169):** sexo feminino, primeira avaliação na genética aos 9 meses por ADNPM, cardiopatia congênita (alteração na implantação das artérias pulmonares) e dismorfias como hipertricose, sinófris, sobrancelhas retificadas, fronte proeminente, olhos também proeminentes, filtro nasolabial longo e bem marcado com boca com cantos para baixo. Cariótipo inicial feito em laboratório externo foi 46,XX. MLPA mostrou uma deleção atípica na região subtelomérica do braço curto do cromossomo 1 que correspondia à síndrome 1p36 atípica. O resultado do *array* (Affymetrix 6.0) mostrou múltiplos rearranjos genômicos envolvendo a região 1p36 que incluem regiões deletadas de cerca de 1.9 Mb (564,620-2,456,203)x1 e 1 Mb (3,474,630-3,461,681)x1, e uma pequena região duplicada de aproximadamente 0.2 Mb (2,473,257-3,446,813)x1. O caso do P44 foi considerado *de novo* com baixo risco de

recorrência para a família após MLPA dos genitores normais. A mãe já tinha um outro filho mais velho normal.

- **Paciente 40 (G-390):** masculino, 4 anos e 2 meses na primeira avaliação, apresentava ADNPM (andou com 2 anos e ainda não falava). Foi prematuro de 36 semanas, nasceu de parto cesárea, apresentou hipóxia neonatal, Apgar 3/8, peso ao nascimento de 1600g, estatura de 40,5cm e necessitou de intubação orotraqueal. No período neonatal descobriu-se a hidrocefalia com necessidade de derivação ventriculoperitoneal, cirurgia para correção de persistência do canal arterial, espícula óssea sacral, hérnia inguinal e umbilical com criptorquidia bilateral. Ao exame físico: microssômico (peso e estatura abaixo de p5), musculatura escassa, hipotonia global, hipertricose generalizada, fronte ampla com protuberância frontal, 3 redemoinhos (2 frontais e um posterior), hipertelorismo ocular, epicanto, fenda palpebral estreita e oblíqua para baixo, cílios longos, sobrancelhas irregulares, orelhas pequenas e de baixa implantação, mamilos hipoplásicos, proeminência óssea nas costelas E, polegares amplos e alargados, criptorquidia bilateral com bolsa escrotal hipoplásica, proeminência óssea sacral com fosseta e pés planos com calcâneo proeminente. Exames complementares: cariótipo de outro serviço 46,XY, RNM coluna lombossacra: cone medular em topografia mais baixa. CT crânio: hidrocefalia com DVP e hipoatenuação da substância branca periventricular. Mapeamento de retina e BERA normais. Estudos por MLPA e CGH-array (*Agilent 105K*) com o seguinte resultado arr[hg18]17p13.3(148,092-2,310,571)x1;17q25.3(74,307,023-78,774,742)x3dn, o qual possibilitou identificar uma deleção de 2 Mb na região subtelomérica do braço curto do cromossomo 17 associada a uma duplicação de 4 Mb na região subtelomérica do braço longo do cromossomo 17, portanto revelando uma alteração complexa do cromossomo 17. Os genitores possuem resultado de MLPA e array normal e uma filha de 12 anos hígida. Ainda, a subsequente investigação utilizando FISH no material genômico do probando e dos pais poderá revelar a estrutura do rearranjo desequilibrado, mostrando ser herdado de um possível rearranjo equilibrado.

- **Paciente 5 (G-311):** feminina, acompanhada desde 1 ano e 6 meses por ADNPM, agenesia de corpo caloso e dismorfias faciais. Sem intercorrências gestacionais, pré ou perinatais, ausência de anóxia neonatal, aos 10 meses durante investigação de ADNPM e hipotonia global, descobriu-se a malformação de SNC. A princípio, as dismorfias passaram quase despercebidas ao exame clínico; no entanto, ao ser incluída em nossa casuística, foram identificadas dismorfias como macrocrania, fronte proeminente, fenda palpebral oblíqua para cima, órbitas rasas, escleras pouco azuladas, orelhas de baixa implantação, ponte nasal achatada com base alargada, palato ogival, boca com cantos para baixo, hipertelorismo mamário e pés planos. Cariótipo 46,XX. MLPA normal e *array* de alta densidade (*Affymetrix CytoScan HD*) identificou uma deleção de 14 kb no cromossomo 17, envolvendo o gene *RAI1* e, assim, estabelecendo o diagnóstico da síndrome de Smith-Magenis (OMIM#182290). Aguardamos estudo dos genitores para conclusão do aconselhamento.

- **Paciente 3 (P-8):** feminina, avaliada aos 2 meses de vida devido a múltiplas malformações congênitas (trigonocefalia, fenda palatina e estenose pulmonar valvar) e ADNPM; além de dismorfias (microsomia, trigonocefalia, órbitas rasas com olhos proeminentes, fossetas pré-auriculares e mãos em postura anômala, entre outras). Cariótipo 46,XX repetido por 3 vezes com resoluções diferentes e confirmando-se normal, ficou então com a suspeita da síndrome gênica de Bohring-Opitz e após *CGH-array* (*Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array*) com o seguinte resultado: arr[hg18] 9p24.3p22.2(116,890–17,629,981)×1;20p13p12.1(8159–14,755,396)×3, revelando uma deleção de 17.6 Mb no braço curto do cromossomo 9 e uma duplicação de 14.8 Mb no braço curto do cromossomo 20. Este rearranjo genômico desequilibrado foi herdado da mãe, que possui uma translocação equilibrada entre os cromossomos 9 e 20 (Figura 8), e portanto, oferece alto risco de recorrência para a prole da mãe da paciente (publicado em Meloni et al., 2012).

Figura 9. (A) Esquema ilustrando as regiões 9p (barra verde) e 20p (barra vermelha) envolvidas na translocação desbalanceada na paciente (em cima) e balanceada na mãe (embaixo). (B e C) FISH para 9p23 com a sonda RP11-143N16 (verde) e para a região 20p13 com a sonda RP11-137P16 (vermelha), mostrando um sinal vermelho ao invés do verde no cromossomo 9 da paciente (B) e a translocação equilibrada na mãe (C).

- **Paciente 4 (P-9):** feto feminino de 28 semanas que foi a óbito por atraso de crescimento intrauterino e múltiplas malformações, como hérnia diafragmática extensa e pés tortos. Exame físico detalhado com medidas corporais identificou: microsomia importante (RCIU), fácies não grosseira, orelhas de baixa implantação, hipertelorismo ocular (DIP 3,0) sem opacidade corneana, fenda palpebral horizontalizada, ponte nasal alargada, hipoplasia face média, boca com cantos para baixo, pescoço alado, hipertelorismo mamário, protrusão abdominal, abdome tenso, genital feminino típico e ânus pérvio. Coluna vertebral sem desvios e íntegra, pés tortos (talo vertical) pior a E, calcâneo proeminente, pregas palmares típicas, unhas normais. Cariótipo fetal: 46,XX. O *array* (Illumina 300K) arr[hg19]15q26.1q26.3(92,396,849-102,423,577)x1 identificou uma microdeleção subtelomérica no braço longo do cromossomo 15 de origem paterna – o que esclareceu o diagnóstico do espectro da microdeleção 15q24 (OMIM#613406). Como o cariótipo e *array* paternos foram normais concluiu-se o aconselhamento como de baixo risco e, posteriormente, o casal teve um menino saudável.

- **Paciente 11 (G-237):** feminina, primeira avaliação do geneticista com 10 meses por ADNPM e dismorfias. Ao exame morfológico foi evidenciado: baixa estatura, déficit ponderoestatural, agitação psicomotora, atraso global, microcefalia com bossa frontal lembrando até uma trigonocefalia discreta devido a sutura metópica proeminente, fendas palpebrais estreitas com olhos

fundos e nariz bulboso. Mãe parece ter um discreto comprometimento cognitivo, mas não apresenta o mesmo fenótipo facial. Possui cariótipo externo 46,XX e MLPA (combinação de *kits*) normal. Foi então, realizado o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip*, que revelou uma deleção de 1,3 Mb no braço longo do cromossomo 1; i.e, arr[hg18]1q21.1q21.2(146,512,899-147,826,658)x1 mais distal, poupando a região previamente descrita em alguns pacientes com síndrome TAR e que explica completamente o fenótipo da paciente (Brunetti-Pierri et al., 2008). Aguarda FISH dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 15 (G-497):** feminina, acompanhada na Unidade de Genética do Instituto da Criança desde 1 ano de vida por ADNPM, múltiplas malformações congênitas, surdez unilateral e dismorfias. Ao exame físico apresentava microcefalia, cabelos esparsos, ptose palpebral, fosseta pré-auricular bilateral, baixa implantação de orelhas, hipertelorismo mamário com mamilos hipoplásicos, sopro cardíaco, frouxidão ligamentar, cúbitos valgos e hipoplasia ungueal do 5º dedo das mãos bilateral. Após exames complementares evidenciou-se: variante Dandy-Walker (malformação da fossa cerebral posterior) em tomografia de crânio, ecocardiograma com persistência de canal arterial, escoliose lombar com anomalia vertebral lombossacra, US pélvica com hipoplasia uterina e BERA com perda auditiva grave. Cariótipo com bandas G realizado em 2 locais diferentes 46,XX,inv(9) variante da normalidade, MLPA (diversos *kits*) normal e o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* revelou arr[hg18] 6q25.2q27(153,258,023 - 165,115,007)x1 – uma deleção de 11,9 Mb no braço longo do cromossomo 6, se estendendo de 6q25.2 a 6q27 região que envolve 144 genes, sendo 30 com fenótipo reconhecido; entre eles o gene *ARID1B*, cuja haploinsuficiência já foi descrita como responsável pela síndrome de Coffin-Siris compatível com o fenótipo descrito da paciente (Sim et al., 2014; Vengoechea et al., 2014).

- **Paciente 21 (G-359):** masculino, avaliado aos 2 meses por médico geneticista ambulatoriamente, após nascer com cardiopatia congênita do tipo estenose aórtica. Apresentava cariótipo 46,XY e FISH para 22q11.22 normal excluindo quadros típicos da síndrome de Di George apesar de fenótipo não

compatível. Pensando na síndrome de Williams-Beuren por suspeita de íris estrelada ao exame físico (que não se confirmou após avaliação oftalmológica), quando foi então encaminhado para análise combinada MLPA-array. A técnica de MLPA apresentou resultados normais. Já a análise por *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* detectou arr[hg19]6q24.3q25.1(148,971,363-149,820,948)x1 – uma perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 850 kb, localizada no braço longo do cromossomo 6, que se estende de 6q24.3 a 6q25.1, envolvendo 4 genes com fenótipo reconhecido; entre eles o gene *TAB2*, que foi recentemente associado a múltiplos defeitos cardíacos congênitos, mas as deleções encontradas nos pacientes costumam ser maiores na região 6q25.1. Apenas 2 pacientes foram descritos com deleções menores, de 600 kb e 200 kb até o momento (Salpietro et al., 2015; Weiss et al., 2015), sendo este último familiar com mãe e avó materna também afetadas. Dessa forma, considera-se que a cardiopatia congênita do paciente possa ser atribuída à haploinsuficiência do gene *TAB2*. Recomenda-se estudo por *array* dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 26 (12-B):** masculino, 14 anos, avaliado e acompanhado no Centro de Genética Médica da UNIFESP por Complexo de Sakoda (espectro malformativo que envolve meningocele basal esfenotmoidal, agenesia de corpo caloso e coloboma de disco óptico), ficando então com a suspeita clínica da síndrome de Morning-Glory (Dempsey et al., 2007). Paciente apresenta história de prematuridade, deficiência intelectual, traços autistas, diversas dismorfias, como fronte ampla, ponte nasal baixa, base nasal alargada, proptose ocular, hipertelorismo ocular, sobrancelhas esparsas, fenda palatina e pés tortos. Realizou cariótipo e MLPA normais, no entanto o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* revelou arr[hg19] 16p12.2(21,599,125-21,740,231)x1. Foi detectada a perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 141kb, localizada no braço curto do cromossomo 16, que se estende na região crítica 16p12.2, envolvendo 4 genes com fenótipo reconhecido. Deleções nesta região já foram relacionadas a múltiplas malformações (fendas orofaciais, malformação do SNC como agenesia de corpo caloso, malformações urogenitais, cardíacas e dentárias), deficiência

intelectual e transtorno do espectro autista. Este resultado é compatível com o espectro da síndrome de microdeleção 16p12.2 (Girirajan et al., 2015). Recomenda-se estudo por FISH ou *array* dos genitores para conclusão do aconselhamento genético, uma vez que 95% dos casos foram herdados de um dos genitores.

Também foi encontrada outra perda de um segmento genômico (deleção) de 408kb, localizada no braço longo do cromossomo Y, abrangendo a região Yq11.223 com 12 genes, mas apenas um segmento do gene com registro OMIM, o *DAZ3*, relacionado à azoospermia. Esta CNV consta no *Database of Genomic Variants* (DGV), portanto foi considerada benigna.

- **Paciente 29 (G-191):** masculino, 20 anos de idade, acompanha com médico geneticista desde 8 anos por atraso de desenvolvimento e fala, além de múltiplas malformações, como refluxo vesicoureteral grau II, duplo arco aórtico com persistência de canal arterial operado, microcefalia, fusão do segmento anterior dos arcos costais, micropênis, criptorquidia, hérnia inguinal bilateral e polidactilia pós-axial das mãos herdada do pai, provavelmente sem relação com o fenótipo. Seguia sem uma hipótese diagnóstica clara, apenas em uma das consultas é referida a suspeita da síndrome de Rubinstein-Taybi que não se sustentou clinicamente, uma vez que o fenótipo facial não era típico. Tinha cariótipo com bandas G e MLPA normais. Foi então realizado o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip*, que revelou um resultado surpreendente - arr[hg19] 22q13.2(41,042,091-41,640,297)x1 – a perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 598kb, localizado no braço longo do cromossomo 22, na região 22q13.2, envolvendo 18 genes, sendo 9 com fenótipo reconhecido, entre eles está o gene *EP300* responsável pela síndrome Rubinstein-Taybi 2, compatível com o fenótipo clínico do paciente por ser uma variante mais leve da síndrome (Solomon et al., 2015). Também foi encontrado o ganho de um segmento genômico (duplicação) de aproximadamente 103 kb, localizado no braço curto do cromossomo 8, região 8p22, que envolve parte do gene *SGCZ*. Este CNV consta no *Database of Genomic Variants* (DGV), portanto foi considerado benigno. Recomenda-se o estudo por FISH dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 53 (G-148):** masculino, 5 anos, avaliado por médico geneticista durante internação na pediatria para investigação de epilepsia e broncoespasmo. O fenótipo facial lembrava discretamente a síndrome de 4p- (microdeleção subtelomérica do braço curto do cromossomo 4) pelas sobrelanceiras arqueadas, fendas palpebrais oblíquas para cima, hipertelorismo ocular (“fácies de Elfo”), também apresentava microssomia e importante ADNPM, além de epilepsia de difícil controle. Foi realizado o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* que revelou - arr[hg19]4p16.3p16.1(48,283-9,370,908)x1; 8p23.3p23.1(176,818-6,974,050)x3 – a perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 9,3 Mb, localizado no braço curto do cromossomo 4, que se estende na região subtelomérica de 4p16.1 a 4p16.3, envolvendo 197 genes, sendo 30 com fenótipo reconhecido, entre eles os genes da região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn. Este resultado foi confirmado por MLPA (*kits* P036 e P070). Também foi encontrado ganho de um segmento genômico (duplicação) de aproximadamente 6,8 Mb, localizado no braço curto do cromossomo 8, na região subtelomérica que se estende de 8p23.1 a 8p23.3, envolvendo 62 genes, sendo 30 com fenótipo reconhecido. Este é um caso de síndrome de Wolf-Hirschhorn por translocação desequilibrada entre os cromossomos 4 e 8, quadro muito semelhante foi descrito por Dai et al. (2013). Quadros assim ocorrem em 40-45% das deleções subteloméricas envolvendo o braço curto do cromossomo 4. Recomenda-se cariótipo e estudo por FISH dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 56 (G-928):** feminina, 24 anos, iniciou o acompanhamento genético com 2 anos e 3 meses por atraso global do desenvolvimento, déficit ponderoestatural, cardiopatia congênita (CIA com hipertensão pulmonar, PCA e alteração valva pulmonar) e heterotaxia (asplenia e fígado aumentado por provável isomerismo direito). Ao exame físico apresentava baixa estatura, microcefalia, assimetria dos dimídios corporais (todo o lado direito parecia assimétrico em comparação com o lado esquerdo da face, tronco e membros), nariz proeminente (adunco), orelhas de baixa implantação, retrognatía, palato ogival, pescoço alado, cifose torácica, ombro D mais alto que o esquerdo

secundário à escoliose, obesidade truncal, dedos afilados com almofadas digitais proeminentes, pés com edema em tornozelo e dorso dos pés bilateral simétrico. Durante o seguimento clínico ficou com a hipótese diagnóstica de síndrome de Ivemark. Apresentou diversos quadros infecciosos, pulmonares e também celulites em MMII com piora progressiva do edema em tornozelos chegando a causar deformidade nos pés e descobriu rim em ferradura. Apresentava cariótipo normal 46,XX e foi selecionada depois de longa espera para a análise combinada MLPA-array que revelou arr[hg19]16q24.1q24.3 (85,817,324-90,148,796)x3;16p13.3(215,379-828,466)x1, - ganho de um segmento genômico (duplicação) de aproximadamente 4,3 Mb, localizado no braço longo do cromossomo 16, se estendendo de 16q24.1 a 16q24.3, envolvendo 103 genes, sendo 30 com fenótipo reconhecido. Dentre eles, estão os genes *FOXC21*, relacionado ao quadro de linfedema-distiquíase de herança autossômica dominante com pacientes já relatados com pescoço alado, cardiopatia congênita, malformação renal e deficiência intelectual além do quadro vascular e oftalmológico típicos. Este último não é presente em todos os pacientes. Quando ocorre a haploinsuficiência do gene *FOXC21* acompanhado do gene *FOXF12* há descrição de cardiopatia congênita, malformação renal e defeitos de lateralidade em tórax e abdômen. O gene *TUBB3* está associado a alterações corticiais e também disgenesia de corpo caloso e o gene *ANKRD11*, responsável pela síndrome de KBG que tem como sinal proeminente dentes grandes. A paciente parece apresentar uma mistura de sinais e sintomas da haploinsuficiência de todos esses genes (não ficou evidente do *ANKRD11*) causada pela duplicação do segmento genômico, à medida que apresenta importante atraso global do desenvolvimento, deficiência intelectual, microcefalia, cardiopatia congênita, heterotaxia, rim em ferradura e alterações esqueléticas. Também foi encontrada perda de um segmento genômico (deleção) de 613 kb, localizado em 16p13.3, que envolve 30 genes com fenótipo reconhecido. Dentre eles, o gene *CCDC78*, responsável pela miopatia centronuclear 4, de herança autossômica dominante. No entanto, a paciente não parece apresentar este quadro clínico. Portanto, este achado tem significado clínico incerto (VOUS). Recomenda-se estudo dos genitores por citogenética clássica ou FISH para conclusão do aconselhamento genético.

Grupo 2 – VOUS - Alterações genômicas de significado clínico incerto:

neste grupo foram incluídos os pacientes em que as alterações do número de cópias eram maiores que 200 kb, em regiões que envolviam genes responsáveis por fenótipos, mas que não parecem explicar a clínica dos pacientes, ou seja, foram os casos **inconclusivos**. Alterações como estas estão presentes nos pacientes descritos a seguir:

- **Paciente 45 (16-B):** masculino, 13 anos, transtorno do espectro autista, apresenta *flapping*, automatismos, agitação psicomotora importante, dismorfias faciais como braquicefalia, sobrancelhas esparsas, orelhas rodadas, ponte nasal baixa. Cariótipo com a inversão pericêntrica do cromossomo 9 herdada do pai (variação da normalidade). Foi solicitada a análise combinada MLPA-array que apresentou resultado da técnica de MLPA normal, mas o *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* detectou arr[hg19]Xp22.33(1,635,520-2,533,704)x3 – ganho de um segmento genômico (duplicação) de aproximadamente 900 kb, localizado no braço curto do cromossomo X, na região Xp22.33, envolvendo 9 genes com fenótipo reconhecido. Duplicações semelhantes constam no DECIPHER com alguns casos de deficiência intelectual e transtorno do espectro autista mais frequente em pacientes do sexo masculino, mas há também casos de duplicações semelhantes na população geral. Dessa forma, considera-se que este achado tem significado clínico incerto (VOUS). Recomenda-se estudo por FISH e *array* dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 38 (G-524):** feminina, 22 anos, acompanha na Unidade de Genética do Instituto da Criança desde os 2 anos de idade para investigação de ADNPM importante, convulsões e múltiplas malformações congênitas como estenose supraavalar aórtica operada, fenda palatina, apêndice pré-auricular bilateral, defeito de segmentação vertebral e hérnia umbilical. Sem história de consanguinidade na família e outros 4 irmãos com dificuldade escolar importante e suspeita de deficiência intelectual, mas sem as malformações da paciente. Apresenta cariótipo 46,XX e foi então solicitada investigação combinada por MLPA-array. A técnica de MLPA foi normal, mas o *array*

Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip revelou arr[hg19] 9p23p22.3(13,468,616-14,566,406)x1 – perda de um segmento genômico (deleção) de aproximadamente 1,1 Mb, localizado no braço curto do cromossomo 9, que se estende de 9p23 a 9p22.3, envolvendo 9 genes. Dentre eles, o gene *NFIB*, que está contido na região crítica 4 a 6 Mb da síndrome de microdeleção do braço curto do cromossomo 9 delimitada entre 9p22.2-p23.1. No entanto, não há paciente relatado com apenas este gene deletado para uma boa correlação genótipo-fenótipo. Dessa forma, considera-se que este achado tem significado clínico incerto (VOUS). Recomenda-se estudo por FISH e *array* dos genitores para conclusão do aconselhamento genético.

- **Paciente 7 (6-B):** RN avaliado ainda na UTI neonatal por múltiplas malformações congênitas não especificadas e devido à suspeita clínica de síndrome de Di George com cariótipo normal. Foi encaminhada amostra para a análise combinada MLPA-*array* que identificou arr[hg19]18q22.2q22.3(68,090,674-68,756,043)x3 – ganho de um segmento genômico (duplicação) de aproximadamente 666 kb, localizada no braço longo do cromossomo 18, que se estende de 18q22.2 a 18q22.3, não envolvendo genes OMIM. No entanto, esta região está contida na região crítica investigada por causar a síndrome de Edwards (Ceccarini et al., 2007). Duplicações de tamanho e local semelhantes, ausente em genes OMIM ainda não foi relacionada a fenótipo clínico bem estabelecido. Dessa forma, considera-se que este achado tem significado clínico incerto (VOUS). Recomenda-se estudo por citogenética clássica, FISH e/ou *array* dos genitores para a conclusão do aconselhamento genético.

Paciente 24 (7-B): masculino, 1 ano e 7 meses quando avaliado pelo imunologista pediátrico, nasceu com interrupção de arco aórtico tipo B e comunicação interventricular, sendo a primeira anomalia corrigida com 13 dias de vida com boa evolução. Ainda sem aquisição da linguagem. Não há relato detalhado sobre os marcos do desenvolvimento da criança. Devido aos baixos valores de linfócitos associados à cardiopatia congênita, foi pensada na síndrome de Di George, apesar do fenótipo clínico não ser compatível (não tinha dismorfias faciais típicas da síndrome). Não há história de doenças

psiquiátricas na família. A análise por *array Illumina HumanCytoSNP-12 beadchip* com resultado arr[hg19]11q24.2(126,501,321-126,671,28)x3 – revelou uma duplicação de 170kb no braço longo do cromossomo 11 que envolve apenas um segmento do gene *KIRREL3*, responsável por alguns casos de deficiência intelectual do tipo 4, de herança autossômica dominante. Bhalla et al. (2008) descreveram 3 pacientes com deficiência intelectual grave com mutações no gene *KIRREL3*. No DGV há apenas um caso com uma deleção menor na mesma região do gene *KIRREL3*. Não há casos de duplicações nesta região no DGV. Portanto, pela idade do paciente e difícil correlação genótipo-fenótipo essa variante foi classificada como de significado clínico incerto (VOUS) e merece ser reavaliada futuramente com a evolução clínica do paciente. O espectro da deleção do cromossomo 22q11.22 foi afastada definitivamente para este paciente.

Grupo 3 – BENIGNOS - Alterações genômicas consideradas benignas ou resultado de *array* normal:

- **Paciente 41 (G-157):** sexo feminino, acompanhada desde o nascimento por hipotonia muscular global, infecções recorrentes, após o segundo dia de vida foi afastado erro inato do metabolismo com a triagem neonatal ampliada normal. Mas, devido à recorrência de infecções pulmonares, foi diagnosticada com hipogamaglobulinemia e segue tratamento com imunologista. Apresenta ADNPM, atraso de linguagem com investigação auditiva normal, macrocrania sem hidrocefalia, dismorfias faciais como sobrelhas proeminentes e arqueadas, fâcies grosseira, hipertricrose e nariz com base alargada quase em sela, com radiografia de esqueleto normal. Apresenta cariótipo 46,XX, resultado de MLPA (3 *kits*) normal e o *array (Affymetrix CytoScan HD array)* detectou pequenas deleções de 20 kb em 2q33.1 (203,291,000-203,312,000) e 4 kb em 3q28 (189,360,000-189,364,000) com poucos genes que não explicam o fenótipo ou sem genes (respectivamente). Realizado o *array* parental de menor densidade sem demonstrar as alterações encontradas na paciente. Mas devido ao tamanho e ao conteúdo gênico, as alterações foram consideradas benignas.

- **Paciente 22 (P22/ G-241):** feminina, 17 anos na primeira consulta com geneticista por ADNPM pregresso e deficiência intelectual atual acompanhada de baixa estatura e dismorfias. História familiar: mãe de 42 anos descobriu, durante o seguimento genético por queixa de dispneia a médios esforços com sopro cardíaco auscultado pela geneticista, que era portadora de uma CIA de 4cm. A P22 é sua primeira filha de outro relacionamento e no segundo casamento apresentou 2 abortamentos de primeiro trimestre e na quarta gestação teve outra menina com fenótipo idêntico à P22 (o qual lembra o da síndrome tricornofalangeana) e também evoluindo com ADNPM desde 6 meses. P22 tem ECG alterado com arritmia e aumento da área cardíaca sem alteração anatômica. Cariótipo 46,XX e ao exame físico: baixa estatura (<p5), obesidade (p>90; IMC 32,8), cifose, estrabismo, padrão de gordura centrípeta, dentes cônicos e tortos, estrias abdominais, nariz em forma de pera, mãos com polegar de implantação proximal e dedos fusiformes com poucas pregas palmares e muitos verticilos nas almofadas digitais. Pés planos. O resultado de MLPA foi normal. E o *array (AffymetrixHD)* foi inconclusivo: del(Xq22.1)/del(17q23.3) – sugerindo alterações benignas, que não foram herdadas da mãe e também não estão presentes na meia-irmã. *HumanCytoSNP-12 BeadChip* da meia-irmã com fenótipo muito semelhante (paciente 47 – G-242) apresentou dup 4q28.3 (362 kb), del 22q11.23→q12.1 (178,2 kb) sem envolver a região crítica da síndrome de Di George e dup Xq22.2 (124,8 kb), interpretadas como benignas também por terem sido herdadas da mãe e não serem suficientes para explicar o quadro genético familiar, pois não apareciam no trio afetado (mãe e duas filhas). O diagnóstico etiológico do quadro familiar continua em aberto e talvez o exoma do trio possa contribuir para a identificação de uma síndrome gênica ainda não suspeitada ou de um novo gene relacionado a uma doença rara de herança autossômica dominante.

- **Paciente 13 (G-344):** paciente avaliada por geneticista na UTI neonatal no primeiro dia de vida por macrocrania e suspeita de hidrocefalia ao US pós-natal. Ao exame físico, chamava a atenção a hipotonia global, macrocrania com fronte proeminente, fácies alongado e estrabismo convergente importante sem outras alterações. Dificuldade para sugar e progredir a alimentação. No

momento da avaliação não havia familiar acompanhando a paciente e não foi possível obter a história familiar. Só constava no prontuário do hospital que não havia consanguinidade. Foi então solicitado cariótipo com bandas G e já colhido material para MLPA pela forte suspeita de síndrome de microdeleção. No momento do primeiro retorno ambulatorial, a paciente já tinha resultado de cariótipo e MLPA normais e aguardava o *array* já em execução. Mas a mãe foi bem clara em informar que na família existiam vários casos de deficiência intelectual, sendo sempre os meninos piores que as meninas. Ao construir o heredograma, ficou clara a herança ligada ao cromossomo X. Foi então solicitada a pesquisa molecular para X frágil, que veio positiva, confirmando mais de 200 repetições CGG em um dos cromossomos X da paciente. A mãe apresentava a pré-mutação com 150 repetições CGG. A análise pelo *array HumanCytoSNP-12 BeadChip* apresentou a perda de um segmento genômico de 255 kb na região 8p23.2, não contendo genes com fenótipo; e, dessa forma, esta CNV foi classificada como benigna e liberado o laudo de *array* normal, sendo concluído o diagnóstico da síndrome do X frágil na paciente e em seus primos de primeiro grau. Ficou estabelecido alto risco de recorrência para as próximas gestações da mãe.

- **Paciente 60 (G-393):** masculino, 5 anos, encaminhado ao médico geneticista para investigação de obesidade e atraso de desenvolvimento. Sem intercorrências gestacionais e de parto. No primeiro ano de vida, apresentou dificuldade para ganho de peso devido à hipotonia importante e disfagia, a partir dos 3 anos passou a apresentar ganho de peso exagerado. Apresenta compulsão alimentar, atraso motor pregresso e de fala atual. Pés e mãos pequenos. Diminuição da reação à dor. Realizado teste de metilação na USP para síndrome de Prader-Willi (PWS) que foi normal. Foi, então, solicitada a análise combinada MLPA-*array* também com resultado normal, o que afasta as síndromes de microdeleção que mimetizam o quadro de PWS. Durante o seguimento clínico, o paciente está evoluindo com hipogonadismo, que está sendo melhor investigado e pode ser uma nova pista para síndromes gênicas relacionadas, as quais poderão ser diagnosticadas pelo sequenciamento completo do exoma no futuro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o desenvolvimento deste trabalho, ressaltam-se alguns pontos importantes: grande parte dos pacientes tem mais de 10 anos de idade e 6 casos tem mais de 20 anos. Isso só comprova que a maior parte dos pacientes com malformações congênitas só é diagnosticada longo tempo após o nascimento no Brasil, devido à longa espera pelo acesso às novas técnicas citogenômicas como o *array* (Evangelidou et al., 2010).

O presente estudo identificou aproximadamente 47% de desequilíbrios no número de cópias gênicas (somando alterações patogênicas e VOUS), o que está um pouco acima dos índices encontrados na literatura, que é em torno de 20 a 30% de resultados de *array* alterados em pacientes com deficiência intelectual e/ou ADNPM (Krepischi-Santos et al., 2006). Essa discrepância é compreendida considerando que a literatura mostra pacientes que foram selecionados com base em apenas uma queixa clínica, não levando em conta outros fatores associados como dismorfias características de alterações cromossômicas e avaliação clínica detalhada por médico geneticista, como foi realizado nesta amostra. Algo semelhante foi realizado por Battaglia et al. (2013), que obtiveram 67% de anormalidades em CNV utilizando uma casuística mista de DI de diversos graus e TEA, mas todos com dismorfias, enquanto no mesmo estudo o grupo com DI isolada apresentou 22% de CNVs alteradas. Nossos resultados mostram que nos casos de ADNPM com malformações congênitas associadas é importante o atendimento, se possível por um médico geneticista, no pré e pós natal em qualquer idade, com anamnese direcionada, história familiar abrangente e exame físico detalhado para direcionar de maneira eficiente a investigação diagnóstica.

Dos 33 pacientes com alterações no número de cópias gênicas (CNVs), 29 pacientes (41%) foram classificados como portadores de CNVs patogênicas (aquelas em que os desbalanços genômicos realmente explicam o fenótipo), 4 pacientes (~6%) apresentaram VOUS (variantes genômicas de significado clínico incerto) e 34 pacientes (41%) tinham mais de 2 CNVs, tornando um desafio determinar a exata correlação de cada CNV com o fenótipo clínico

encontrado. Vinte e três pacientes (30%) apresentaram CNVs benignas e quinze pacientes (21%) apresentaram resultado normal.

Entre os casos patogênicos analisados foi possível diagnosticar síndromes já conhecidas. No entanto, apenas em 7 pacientes já havia suspeita do diagnóstico encontrado. Nos demais casos havia apenas uma suspeita inespecífica de síndrome de microdeleção/microduplicação e foi realmente nos casos em que essa suspeita era mais forte que encontramos as CNVs maiores, em regiões críticas de síndromes de microdeleção/microduplicação, ou em região de genes OMIM bem específicos, como o caso recentemente descrito do gene *TAB2* associado a cardiopatias congênitas. Quando compara-se os 3 grupos de classificação de CNVs, algumas diferenças são notadas. No grupo 1 de alterações patogênicas, todos os pacientes apresentavam importante ADNPM com múltiplas malformações (no mínimo 1 ou 2 malformações maiores, dessas, as mais frequentes foram cardiopatia congênita e em segundo malformações do SNC, sendo a mais comum agenesia/disgenesia de corpo caloso), além de dismorfias faciais e alterações discretas em mãos e pés (como exemplo, dedos afilados, clinodactilia do 5º dedo das mãos, unhas hipoplásicas, edema em tornozelos, etc). Já no grupo 2, a clínica não estava bem detalhada, muitas vezes até pela impossibilidade (2 pacientes eram recém-nascidos e poderiam não apresentar o fenótipo completamente evoluído, fato comum em algumas microdeleções como na síndrome de Di George e Williams-Beuren); já nos pacientes com alterações benignas, 2 deles obtiveram posteriormente outro diagnóstico estabelecido por outra técnica, o caso da síndrome de X frágil na paciente 13 (G-344) e a síndrome de Charge na paciente 8 (18-B), isto permite ilustrar que a maioria dos pacientes com alterações benignas ou *array* normal pode ter uma síndrome gênica que ainda não foi suspeitada. Boa parte dos pacientes deste grupo pode se beneficiar do sequenciamento completo do exoma. Raros pacientes neste grupo apresentam múltiplas malformações maiores (microftalmia com coloboma de íris e retina bilateral, fenda palatina em U e malformação renal), além de diversas dismorfias faciais, como é o caso do paciente 30 (G-217), que apresentou CNVs benignas que constam no DGV e não contém genes OMIM, e que

provavelmente, deve se tratar de uma síndrome gênica relacionada à microftalmia.

Correlações genótipo-fenótipo nos rearranjos em 1p36 são difíceis, principalmente devido à heterogeneidade fenotípica entre os pacientes com aberrações cromossômicas semelhantes (Rosenfeld et al., 2011). Até o momento, foram descritos vários casos distintos de microrrearranjos na região 1p36 por diferentes plataformas de *array* (Giannikou et al., 2012).

Toda essa complexidade foi claramente demonstrada na elucidação diagnóstica da paciente 44 (G-169), sendo necessário o estudo molecular detalhado por *array* que revelou uma etiologia mais complexa conhecida como catástrofe cromossômica na região 1p36 para tal paciente. Este possível mecanismo de “*chromothripsis*” na região subtelomérica 1p36, com seguimentos genômicos deletados intercalados por seguimentos normais e duplicados, colaborou diretamente para explicar a diversidade do fenótipo, que inicialmente não apontava para a síndrome 1p36 (Zanardo et al., 2014) na presente paciente.

De forma semelhante ao ocorrido com o paciente 2 (G-101), que apresenta quadro clínico atípico, com ausência das dismorfias faciais características da síndrome da microdeleção do cromossomo 22q11.21, mas com muitas manifestações psiquiátricas, como sua mãe, que também tem a mesma deleção. Segundo Bassett et al. (2011), a síndrome da deleção 22q11.21 é o quadro de microdeleção mais comum com envolvimento cardiovascular e palatino. Suspeita-se ser pouco reconhecido devido à variabilidade clínica que a transforma em um espectro clínico. Possui prevalência estimada de 1:2.000 a 4.000 nascidos vivos nos EUA. Suas características clássicas incluem imunodeficiência (77% dos pacientes), alterações palatinas (76%), cardiopatias congênitas (75%), disfunções endócrinas (50%), sintomas gastrointestinais (35%), doença renal (35%) e ADNPM (25%) com risco de desenvolver esquizofrenia na vida adulta. A assimetria facial ao choro, do inglês *asymmetric crying face* (ACF) tem sido relacionada à deleção do cromossomo 22q11.2 (14% dos pacientes com esta deleção apresentaram ACF), como descrito por Pasick et al. (2013).

Assim, consideramos que o estudo por *array* deve ser aplicado para a elucidação de casos complexos como, por exemplo, o rearranjo desequilibrado da paciente 3 (P-8) entre os cromossomos 9 e 20, e que foi herdado de um translocação equilibrada da mãe, conferindo um risco de recorrência alto para a família conforme reportado em Meloni et al. (2012). Rearranjos cromossômicos complexos são considerados eventos citogenéticos raros. A maioria dos rearranjos complexos aparentemente equilibrados é esporádico e é encontrado em pacientes com fenótipo anormal. As técnicas citogenômicas combinadas (FISH, MLPA e *array*) são capazes de revelar desequilíbrios genômicos em grande parte desses casos (Guilherme et al., 2013).

Já para o caso da paciente 5 (G-311), que apresentou uma deleção pequena de 14 kb no gene *RAI1*, diagnosticando a síndrome Smith-Magenis, detectada por *SNP-array*, o diagnóstico jamais seria obtido por outras plataformas de *array* de menor densidade (Andrieux et al., 2007). A síndrome Smith-Magenis (SMS; OMIM 182290) é uma doença complexa de incidência estimada em 1:15.000–25.000 nascimentos, tipicamente causada por uma deleção grande em 17p11.2, envolvendo vários genes, mas principalmente o gene do ácido retinóico-induzido (*RAI1*). Em raros casos, mutações neste gene podem causar a síndrome de Smith-Magenis. O fenótipo característico deve-se a uma combinação de sinais e sintomas como distúrbios do sono, anomalias craniofaciais e esqueléticas, alterações de comportamentos como a autoagressão, além de ADNPM e atraso para a aquisição da linguagem (Vieira et al., 2011).

Da mesma forma, o estudo completo de uma família portadora de um desequilíbrio genômico transgeracional, foi possível graças a uma estratégia combinada, utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular (Christofolini et al., 2014).

Por outro lado, nos casos das pacientes 41 (G-157) e 22 (G-241), que apresentam quadros clínicos menos distinguíveis e não compatíveis com outros casos anteriormente descritos, as técnicas de MLPA e *array* não foram suficientes para esclarecer o diagnóstico, mesmo após estudo por *array* dos genitores, que foi importante para ajudar a classificar as CNVs detectadas como benignas; não estabelecendo, portanto, a etiologia genética destas

pacientes e, talvez isso apenas seja possível, após o sequenciamento de exoma destas pacientes (Rabbani et al., 2013; Zawati et al., 2013). As alterações encontradas por *array* na paciente 41 (pequenas deleções em 2q33.1 e 3q) foram consideradas polimorfismos benignos por estarem presentes no DGV (*Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>)). Já a região extensa contínua de perda da heterozigosidade em Xq21.1 deve ser melhor estudada para doenças gênicas recessivas, se beneficiando do sequenciamento de exoma com ênfase nesta região para esclarecimento de sua síndrome genética.

Como fruto deste trabalho, após descrição fenotípica detalhada e análise combinada MLPA-*array* aprofundada dos 71 pacientes, foram criadas diretrizes clinico-laboratoriais visando o estabelecimento de um guia prático que auxiliou muito na obtenção da conclusão diagnóstica adequada para estes pacientes. Além disso, a aplicação do Guia Prático estabelecido como um dos resultados deste trabalho, poderá demonstrar, na rotina clínica, a utilidade da estratégia combinada para o diagnóstico dos pacientes com ADNPM associado à malformação congênita (Quadro 2, Figura 9) (Piazzon; Dias, 2013).

Quadro 2 – Guia prático para solicitação de testes citogenômicos.

Técnica de análise citogenômica	Indicações Clínicas
Cariótipo clássico	Alterações fenotípicas sugestivas de aneuploidias e de grandes alterações estruturais maiores que 5 a 10 Mb. Alterações estruturais equilibradas
MLPA (<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)	Pacientes com cariótipo normal ou duvidoso com hipótese diagnóstica sustentável. Triagem de alterações subteloméricas em indivíduos com deficiência intelectual idiopática. Pacientes ou fetos com malformações congênitas – <i>triagem</i> de alterações genômicas. Pacientes com cariótipo normal com sinais clínicos sugestivos de síndromes de microdeleção.
FISH (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)	Investigação de anormalidades cromossômicas com hipótese diagnóstica precisa. Investigação de alterações cromossômicas no diagnóstico pré-natal ou pós-natal em situações que exijam intervenção médica imediata – resultado rápido. Definição de pontos de quebra em rearranjos cromossômicos. Confirmar alterações detectadas pela técnica de MLPA. Investigação de alterações genômicas para síndromes de microdeleções. Investigação de rearranjos cromossômicos estruturais.
Array	Alterações fenotípicas com cariótipo clássico normal sem quadro clínico sugestivo para aplicação das técnicas de FISH e MLPA. Rearranjos genômicos complexos. Resultados de MLPA e FISH normais com alterações clínicas sugestivas de desequilíbrios genômicos. As alterações encontradas no <i>array</i> devem ser confirmadas por FISH (melhor para o estudo dos pais e definir o aconselhamento genético).

Figura 10. Fluxograma apresentando as diretrizes para o atendimento clínico (previamente publicado no capítulo 10 do livro *Citogenômica Aplicada à Prática Médica*, 2013).

————— **CONCLUSÕES**

8. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou as seguintes conclusões:

- Utilizando a estratégia de análise combinada MLPA-*array* foi possível caracterizar diferentes alterações genômicas, incluindo deleções, duplicações, regiões de homozigose e alterações complexas.
- Esclarecemos a etiologia e concluímos o diagnóstico para 29 pacientes.
- Determinamos o tamanho das regiões deletadas e duplicadas e inferimos as coordenadas genômicas de cada alteração encontrada para os 33 pacientes (patogênicas e VOUS).
- A descrição completa do fenótipo clínico de todos os pacientes com CNVs patogênicas, com significado incerto (VOUS) e de alguns com alterações benignas e com *array* normal foi realizada de maneira detalhada e foram aqui relatados.
- O estudo da correlação genótipo-fenótipo foi realizado para todos os 33 pacientes que apresentaram alterações genômicas. Inclusive para os pacientes que tiveram alterações consideradas benignas, para os quais a correlação genótipo-fenótipo foi importante para considerar o seu resultado de MLPA-*array* normal. Após avaliar o quadro clínico dos pacientes que apresentaram resultados normais, conclui-se a necessidade de prosseguir a investigação etiológica utilizando outras técnicas genéticas. Sugerimos que o sequenciamento completo do exoma possa ser uma alternativa viável para a conclusão diagnóstica desses pacientes.

- Foi possível confeccionar um Guia Prático para auxiliar na escolha adequada de cada teste citogenômico.
- Foi possível estabelecer um fluxograma com as diretrizes de atendimento de Genética Médica ao investigar um paciente com ADNPM associado à malformação congênita com foco nos recursos disponíveis no Brasil.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os pacientes

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: **Nº:** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: **Nº:** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

"Investigação Clínica e Citogenética Molecular em portadores de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita"

PESQUISADORA: Dra. Chong Ae Kim

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ **RISCO MÉDIO** ☐
RISCO BAIXO ☐ **RISCO MAIOR** ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Este projeto de pesquisa é importante para ajudar a definir o diagnóstico da doença do seu filho(a) que possui atraso no desenvolvimento e/ou malformações. Seu filho(a) está sendo convidado a participar deste estudo. Em algumas doenças genéticas com problemas como o do seu filho o diagnóstico não pode ser feito apenas pela consulta médica com geneticista, exames de imagem e o cariótipo. No caso do seu filho(a), para explicar a causa da doença, precisamos fazer exames mais complexos que procuram pequenas perdas ou ganhos no material genético no sangue da criança.

2 – Será realizada uma entrevista com os pais ou responsáveis, incluindo a história da família, um exame físico no filho(a) e serão tiradas fotografias dos pacientes para podermos guardar com mais precisão as características do rosto, do corpo, das mãos e pés que podem mudar com os anos e são muito úteis para a discussão entre os médicos que estão tentando fazer o diagnóstico da doença. Serão ainda pedidos (caso o paciente não tenha realizado) exames de imagem como raio-X do esqueleto, ultrassonografia abdome, ecocardiograma, tomografia ou ressonância do crânio se pertinentes para investigação do paciente. Esses exames procurarão malformações em vários órgãos internos do corpo. Também será necessário um exame de sangue para procurar pequenas alterações no material genético da criança que poderiam explicar os problemas de saúde do paciente. Guardaremos uma amostra do material genético para sempre que possível procurar mais alterações neste material, o que poderia explicar a doença.

3 – Será colhida uma amostra de sangue da veia do braço que é suficiente para diferentes exames de sangue relacionados a essa pesquisa. No caso de algum dos exames apresentar um resultado alterado, solicitaremos aos pais que retornem para explicação do resultado e para discutir se será necessário ou não uma investigação adicional com novos exames da criança e possivelmente dos pais. Em alguns casos outros familiares, como por exemplo, os avós ou irmãos, também poderão fazer parte do estudo.

4 – O desconforto associado ao exame de sangue consiste apenas daquele relacionado à coleta. Punção Venosa: após punção venosa ("tirar sangue") o local pode ficar um pouco dolorido. Também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma ("roxo") que pode persistir por alguns dias; porém o mesmo se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

5 – O estudo trará como benefício para o seu filho(a) a possibilidade do diagnóstico. Além disso, permite também saber se a doença vem da família ou não, e, portanto, se esta doença pode repetir em outros filhos(as) do casal.

6 – Não existem outros exames alternativos disponíveis no SUS para a pesquisa das pequenas alterações no material genético relacionados aos problemas do seu filho.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Chong Ae Kim que pode ser encontrada na Unidade de Genética do Instituto da Criança, endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, 7º andar. Telefone (11) 3069-8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento do seu filho(a) na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – A pesquisadora (Dra. Chong Ae Kim) se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Investigação Clínica e Citogenética Molecular em portadores de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita".

Eu discuti com a Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para genitores

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA
1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

"Investigação Clínica e Citogenética Molecular em portadores de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita"

PESQUISADORA: **Dra. Chong Ae Kim**

CARGO/FUNÇÃO: **Chefe da unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **40054**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

3

225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento do seu filho(a) na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – A pesquisadora (Dra. Chong Ae Kim) se compromete a utilizar os dados e o material coletado para esta pesquisa e será armazenado para posterior investigação por métodos ainda não disponíveis.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Investigação Clínica e Citogenética Molecular em portadores de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à malformação congênita".

Eu discuti com a Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

ANEXO C

Laudos de *array* com CNVs patogênicas

ANEXO D

Laudos de *array* com CNVs de significado incerto (VOUS)

ANEXO E

Laudos de *array* com CNVs benignas ou ausência de CNV

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

Andrieux J, Villenet C, Quief S, Lignon S, Geffroy S, Roumier C et al. Genotype phenotype correlation of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridisation array: cleft palate in SMS is associated with larger deletions. *J Med Genet.* 2007;44(8):537-40.

Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, Madan-Khetarpal S, Surti U, Jackson KE, Asamoah A, Brock PL, Gowans GC, Conway RL, Graham JM Jr, Medne L, Zackai EH, Shaikh TH, Geoghegan J, Selzer RR, Eis PS, Bejjani BA, Shaffer LG. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat Genet.* 2007;39(9):1071-3.

Bassett A, McDonald-McGinn M, Devriendt K, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2011;159:332-339.

Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, Filippi T, Carey JC. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013;17(6):589-99.

Battaglia A, Filippi T, Carey JC. Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2008;148C(4):246-51.

Belanger SI, Bellucco FT, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MC, Melaragno MI. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(4):307-11.

Bhalla K, Luo Y, Buchan T, Beachem MA, Guzauskas GF, Ladd S, Bratcher SJ, Schroer RJ, Balsamo J, DuPont BR, Lilien J, Srivastava AK. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in patients with mild to severe intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2008;83(6):703-13.

Biesecker LG. Coupling genomics and human genetics to delineate basic mechanisms of development. *Genet Med.* 2002;4(6 Suppl):39S-42S.

Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008;40(12):1466-71.

Bruno DL, Stark Z, Amor DJ, Burgess T, Butler K, Corrie S et al. Extending the Scope of Diagnostic Chromosome Analysis: Detection of Single Gene Defects using High-Resolution SNP Microarrays. *Hum Mutat.* 2011; 32:1500–1506.

Ceccarini C, Sinibaldi L, Bernardini L, De Simone R, Mingarelli R, Novelli A, Dallapiccola B. Duplication 18q21.31-q22.2. *Am J Med Genet A*. 2007;143(4):343-8.

Chance PF, Lensch MW, Lipe H, Brown RH Sr, Brown RH Jr, Bird TD. Hereditary neuralgic amyotrophy and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: two distinct genetic disorders. *Neurology*. 1994;44(12):2253-7.

Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;66(4):257-67.

Christofolini DM, de Paula Ramos MA, Kulikowski LD, da Silva Bellucco FT, Belangero SI, Brunoni D, Melaragno MI. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. *J Intellect Disabil Res*. 2010;54(10):938-42.

Christofolini DM, Piazzon FB, Evo C, Mafrá FA, Cosenza SR, Dias AT, Barbosa CP, Bianco B, Kulikowski LD. Complex small supernumerary marker chromosome with a 15q/16p duplication: clinical implications. *Mol Cytogenet*. 2014;7:29.

Dai Y, Yang J, Chen Y, Bao L, Cheng Q. Microarray analysis of unbalanced translocation in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Pediatr Int*. 2013;55(3):368-70.

D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CI, Varela MC, Koiffmann CP. Prader-Willi-like phenotype: investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet*. 2006;49(6):451-60.

de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr*. 2007;166(7):637-43.

Dempsey MA, Torres-Martinez W, Walsh LE. Two cases further delineating the Sakoda complex. *Am J Med Genet A*. 2007;143(4):370-6.

Dutra RL, Pieri PdeC, Teixeira AC, Honjo RS, Bertola DR, Kim CA. Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics*. 2011;66(6):959-64.

Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes*. 2012;5:13.

Dutra RL, Piazzon FB, Zanardo EA, Costa TVMM, Montenegro MM, Novo-Filho GM, et al. Rare genomic rearrangement in a boy with Williams–Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior. *Am J Med Genet Part A*. In press 2015;9999A:1–7.

Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I et al. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Molecular Cytogenetics*. 2010;3-24.

Feenstra I, Vissers LE, Orsel M, van Kessel AG, Brunner HG, Veltman JA, van Ravenswaaij-Arts CM. Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(16):1858-67.

Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG. Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(4):346-56.

Garcia MM, Fernández Martínez FJ, Miranda BE. Repercusión clínica de las anomalías cromosómicas. *An Pediatr (Barc)*. 2004;61(3):236-41.

Giannikou K, Fryssira H, Oikonomakis V, Syrmou A, Kosma K, Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E. Further delineation of novel 1p36 rearrangements by array-CGH analysis: narrowing the breakpoints and clarifying the "extended" phenotype. *Gene*. 2012; 15;506(2):360-8.

Girirajan S, Moeschler J, Rosenfeld J. 16p12.2 Microdeletion. 2015 Feb 26. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *Gene Reviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK274565/>.

GM, et al. Rare genomic rearrangement in a boy with Williams–Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior. *Am J Med Genet Part A*. In press 2015;9999A:1–7.

Guilherme RS, Cernach MCSP, Sfakianakis TE, Takeno SS, Nardozza LMM, Rossi C, Bhatt SS, Liehr T, Melaragno MI. A Complex Chromosome Rearrangement Involving Four Chromosomes, Nine Breakpoints and a Cryptic 0.6-Mb Deletion in a Boy with Cerebellar Hypoplasia and Defects in Skull ossification. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141:317–323.

Hacıhamdioğlu B, Hacıhamdioğlu D, Delil K. 22q11 deletion syndrome: current perspective. *Appl Clin Genet*. 2015.18;8:123-32.

Harper PS. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Hum Genet*. 2006;119(1-2):226-32.

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004;36(9):949-51.

Jensen LR, Lenzner S, Moser B, Freude K, Tzschach A, Wei C, Fryns JP, Chelly J, Turner G, Moraine C, Hamel B, Ropers HH, Kuss AW. X-linked mental retardation: a comprehensive molecular screen of 47 candidate genes from a 7.4 Mb interval in Xp11. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(1):68-75.

Jones, KJ. Smith's recognizable patterns of human malformation. Philadelphia: *Elsevier Saunders*, 2006.

Knight SJ, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 2000;37(6):401-9.

Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999;354(9191):1676-81.

Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cherokee C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):254-61.

Ledbetter DH. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet.* 1992;51(3):451-6.

Martin CL, Warburton D. Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:309-26.

McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 Deletion Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*. 2015.

Meloni VFA, Piazzon FB, Soares Mde F, Takeno SS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Brunoni D, Melaragno MI. Cytogenomic characterization of an unexpected 17.6 Mb 9p deletion associated to a 14.8 Mb 20p duplication in a dysmorphic patient with multiple congenital anomalies presenting a normal G-banding karyotype. *Gene.* 2012;496(1):59-62.

Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FT, Christofolini DM, Kulikowski LD, Cernach MC, Emanuel BS, Melaragno MI. Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet.* 2008;51(3):226-30.

Pasick C, McDonald-McGinn DM, Simbolon C, Low D, Zackai E, Jackson O. Asymmetric crying facies in the 22q11.2 deletion syndrome: implications for future screening. *Clin Pediatr.* 2013;52(12):1144-8.

Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet.* 1992;2:292-300.

Piazzon FB, Dias AT. Diretrizes para a aplicação das técnicas citogenômicas na prática médica. In: Kulikowski LD, org. *Citogenômica Aplicada à Prática Médica*. São Paulo: Atheneu; 2013. p.99-105.

Rabbani B, Tekin M, Mahdiah N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2013.

Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006;43(6):478-89.

Raymond FL, Tarpey P. The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 2:R110-6.

Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, Schinzel A Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics.* 1996;34(1):17-23.

Rosenfeld JA, Lacassie Y, El-Khechen D, Escobar LF, Reggin J, Heuer C, Chen E, Jenkins LS, Collins AT, Zinner S, Babcock M, Morrow B, Schultz RA, Torchia BS, Ballif BC, Tsuchiya KD, Shaffer LG. New cases and refinement of the critical region in the 1q41q42 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet.*; 2011;54(1):42-9.

Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet.* 2004 Oct; 66(4):265-75.

Salpietro V, Ruggieri M, Mankad K, Di Rosa G, Granata F, Loddo I, Moschella E, Calabro MP, Capalbo A, Bernardini L, Novelli A, Polizzi A, Seidler DG, Arrigo T, Briuglia S. A de novo 0.63 Mb 6q25.1 deletion associated with growth failure, congenital heart defect, underdeveloped cerebellar vermis, abnormal cutaneous elasticity and joint laxity. *Am J Med Genet A.* 2015;167(9):2042-51.

Sbruzzi IC, Pereira AC, Vasconcelos B, Honjo RS, Krieger JE, Kim CA. Williams-Beuren syndrome: diagnosis by polymorphic markers. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(2):209-14.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.

Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007;145C(1):87-98.

Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet.* 2000;34:297-329.

Shaffer LG; American College of Medical Genetics Professional Practice and Guidelines Committee American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med.* 2005;7(9):650-4.

Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):642-50.

Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today.* 2008;13(17-18):760-70.

Sim JC, White SM, Fitzpatrick E, Wilson GR, Gillies G, Pope K, Mountford HS, Topping PM, McKee S, Vulto-van Silfhout AT, Jhangiani SN, Muzny DM, Leventer RJ, Delatycki MB, Amor DJ, Lockhart PJ. Expanding the phenotypic spectrum of ARID1B-mediated disorders and identification of altered cell-cycle dynamics due to ARID1B haploinsufficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;27:9:43.

Solomon BD, et al. Expanding the phenotypic spectrum in EP300-related Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(5):1111-6.

Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genetics Dev* 2007, 17:182–192.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-76.

Toruner GA, Streck DL, Schwalb MN, Dermody JJ. An oligonucleotide based array-CGH system for detection of genome wide copy number changes including subtelomeric regions for genetic evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(8):824-9.

Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet.* 2002;3(10):769-78.

van Bever Y, Rooms L, Laridon A, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Kooy RF. Clinical report of a pure subtelomeric 1qter deletion in a boy with mental retardation and multiple anomalies adds further evidence for a specific phenotype. *Am J Med Genet A.* 2005;135(1):91-5.

Vengoechea J, Carpenter L, Zárate YA. Papillary thyroid cancer in a patient with interstitial 6q25 deletion including ARID1B. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(7):1857-9.

Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, De Moor B, Van Hummelen P, Marynen P, Fryns JP, Devriendt K. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(3):413-22.

Vieira GH, Rodriguez JD, Boy R, de Paiva IS, DuPont BR, Moretti-Ferreira D, Srivastava AK. Differential diagnosis of Smith-Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(5):988-92.

Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47(5):289-97.

Weiss K, Applegate C, Wang T, Batista DA. Familial TAB2 microdeletion and congenital heart defects including unusual valve dysplasia and tetralogy of fallot. *Am J Med Genet A*. 2015.

Willis AS, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2012;32(4):315-20.

Zanardo EA, Piazzon FB, Dutra RL, Dias AT, Montenegro MM, Novo-Filho GM, Costa TV, Nascimento AM, Kim CA, Kulikowski LD. Complex structural rearrangement features suggesting chromoanagenesis mechanism in a case of 1p36 deletion syndrome. *Mol Genet Genomics*. 2014;289(6):1037-43.

Zawati MH, Parry D, Thorogood A, Nguyen MT, Boycott KM, Rosenblatt D, Knoppers BM. Reporting results from whole-genome and whole-exome sequencing in clinical practice: a proposal for Canada? *J Med Genet* 2013;0:1-3.

Artigos

Artigo submetido em 01/10/2015

- Cytogenomic Guidelines for analysis and diagnosis in Brazilian patients with congenital malformation and neurological disabilities. **Flavia Piazzon**; Evelin Zanardo, master degree; Alexandre Dias, PhD; Roberta Dutra, PhD; Amom Nascimento; Marilia Montenegro, master degree; Gil Novo-Filho, master degree; Thais Costa, master degree; Mariana oliveira, master degree; Acacia Carvalho, Phd; Maria Isabel Melaragno, Phd; Chong Kim, PhD; Leslie Domenici Kulikowski, Phd; Denise Christofolini, PhD Orphanet Journal of Rare Diseases

Artigos publicados:

- Rare genomic rearrangement in a boy with Williams-Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior. Dutra RL, **Piazzon FB**, Zanardo ÉA, Costa TV, Montenegro MM, Novo-Filho GM, Dias AT, Nascimento AM, Kim CA, Kulikowski LD. Am J Med Genet A. 2015 Sep 30. doi: 10.1002/ajmg.a.37360.

- Complex structural rearrangement features suggesting chromoanagenesis mechanism in a case of 1p36 deletion syndrome. Zanardo ÉA, **Piazzon FB**, Dutra RL, Dias AT, Montenegro MM, Novo-Filho GM, Costa TV, Nascimento AM, Kim CA, Kulikowski LD. Mol Genet Genomics. 2014; 289(6):1037-43. doi: 10.1007/s00438-014-0876-7.

- Complex small supernumerary marker chromosome with a 15q/16p duplication: clinical implications Denise M Christofolini, **Flavia B Piazzon**, Carolina Evo, Fernanda A Mafra, Stella R Cosenza, Alexandre T Dias, Caio P Barbosa, Bianca Bianco and Leslie D Kulikowski Molecular Cytogenetics 2014, 7:29 doi:10.1186/1755-8166-7-29 Published: 24 April 2014

- Wide clinical variability in cat eye syndrome patients: four non-related patients and three patients from the same family. Belangero SI, Pacanaro AN, Bellucco FT, Christofolini DM, Kulikowski LD, Guilherme RS, Bortolai A, Dutra AR, **Piazzon FB**, Cernach MC, Melaragno MI. Cytogenet Genome Res. 2012;138(1):5-10. doi: 10.1159/000341570.

- Cytogenomic characterization of an unexpected 17.6 Mb 9p deletion associated to a 14.8 Mb 20p duplication in a dysmorphic patient with multiple congenital anomalies presenting a normal G-banding karyotype. Meloni Vde F, **Piazzon FB**, Soares Mde F, Takeno SS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Brunoni D, Melaragno MI. Gene. 2012 Mar 15;496(1):59-62. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.007.