SNP *arrays* na detecção de alterações estruturais e
no número de cópias em pacientes portadores de
deficiência intelectual idiopática

SNP arrays as a tool to detect structural alterations
and copy number variations in idiopathic intellectual
disability patients

ALEXSANDRO DOS SANTOS

SNP *arrays* na detecção de alterações estruturais e no número de cópias em pacientes portadores de deficiência intelectual idiopática

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração Biologia (Genética)

Orientadora: Dra. Carla Rosenberg

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Alexsandro dos

SNP *arrays* na detecção de alterações estruturais e no número de cópias em pacientes portadores de deficiência intelectual idiopática / Alexsandro dos Santos ; orientadora Carla Rosenberg. São Paulo, 2017. 150 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Deficiência intelectual. 2. CNV. 3. SNP *array*. 4. Diagnóstico. 5. Mecanismo. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. II. Título

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Carla Rosenberg (Orientadora)

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) concedidos ao aluno (Bolsa de mestrado CNPq 130185/2014-0) e à orientadora (projeto PIPE nº 2012/50981-5; projeto temático nº 2009/00898-1; projeto CEPID Genoma Humano nº 13/08028-1).

Dedico este trabalho à minha família e aos Pacientes, fundamentais no estudo

Agradecimentos

À minha família, em especial a minha mãe, irmã, avó e irmão, por sempre me apoiarem, estarem presentes em todos os momentos que eu precisei, pelo amor, carinho e confiança depositados em mim.

A todos os pacientes e seus respectivos familiares que participaram espontaneamente desta pesquisa e tornaram esta dissertação possível: meus sinceros agradecimentos!

À Profa. Dra. Carla Rosenberg, primeiramente, por me acolher no seu laboratório. Agradeço-a imensamente pela oportunidade, por todos os ensinamentos, por sempre me incentivar e pela confiança depositada em mim durante todo este processo. Serei extremamente grato!

À Profa. Dra. Ângela Vianna-Morgante pelo envio e caracterização de pacientes, bem como pelos ensinamentos e discussões em sala de aula, e pelas valiosas sugestões neste trabalho.

À Dra. Débora Bertola pelo envio e caracterização dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Peter Pearson pela valiosa contribuição no artigo.

Às Professoras Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda e Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno por cederam as sondas pan teloméricas.

À Lígia Vieira, por todos os ensinamentos que me proporcionou, pela ajuda essencial nos experimentos de FISH, pelas risadas e amizade durante todo esse tempo no laboratório.

A todos os meus amigos do Laboratório de Investigação Genética e Humana. Em especial, à Francine, pois sem ela, talvez esse projeto não existisse. Pela amizade, risadas, longas viagens até o Centrinho em Araçatuba para coletar as amostras dos pacientes e por, também, dividir as dificuldades do projeto. Também não poderia deixar de agradecer à Tati, que foi a primeira pessoa que

eu fiz amizade no laboratório. Agradeço-a pelas risadas, confiança, conselhos e, sobretudo, amizade. À Thaise e à Juliana, pela amizade, risadas e por sempre confiarem em mim. E à Darine e Sílvia pelo convívio e amizade.

À equipe do Centrinho de Araçatuba, por todo o suporte no recrutamento e coleta de amostra dos pacientes.

Aos meus amigos do LSSB (IQUSP), em especial à Gisele, à Karine, à Juliana, ao Thom e à Liv, por toda a amizade e por sempre estarem presentes - mesmo eu não fazendo mais parte do LSSB.

A todos os outros amigos que, apesar de não terem sido citados, também tiveram importância nesse trabalho.

RESUMO

Deficiência intelectual é uma condição heterogênea e complexa, diagnosticada em 1-3% da população mundial. Desequilíbrios cromossômicos e variações no número de cópias (CNVs) são as causas mais frequentes de DI e, até recentemente, a maior parte desse desequilíbrio era averiguado por análises citogenéticas convencionais. Antes da utilização de *microarrays* cromossômicos (CMA), a causa etiológica da DI ainda permanecia desconhecida em ~60% dos pacientes. A aplicação de CMA tem revolucionado o diagnóstico da DI e de muitas outras doenças congênitas, permitindo explicar a etiologia molecular de parte da DI através da identificação de CNVs patogênicas. Nos países desenvolvidos, CMA é considerado como primeiro teste para avaliar pacientes com múltiplas anomalias congênitas, DI e/ou autismo. Contudo, nos países em desenvolvimento, a detecção de alterações ainda é feita principalmente por métodos citogenéticos convencionais. O objetivo desse estudo foi identificar, através do uso de SNP *arrays*, o espectro de anomalias cromossômicas presente em uma amostra de 40 pacientes com DI idiopática moderada e grave, apresentando ou não aspectos dismórficos e anomalias congênitas. Em especial, essa coorte de pacientes, em sua maioria (~2/3), não havia sido previamente cariotipada. Embora mundialmente desde 2010 a recomendação seja de realizar *array* antes de cariótipo, a maioria dos pacientes relatados em estudos já havia sido cariotipada antes de *array* ser oferecido a eles como teste. Foram identificadas alterações raras em 18 pacientes (45%). Em 12 (30%) desses Pacientes, as CNVs eram sabidamente patogênicas; esta taxa diagnóstica está muito acima da taxa de detecção reportada na literatura (~20%) e possíveis causas desta discrepância são discutidas. Outros 6 Pacientes (15%) apresentaram variantes raras de significado incerto (*variants of unknown significance* - VUS). Um aspecto adicional investigado foram os mecanismos envolvidos na formação de alguns dos rearranjos estruturais; enquanto nosso foco inicial era o uso de *arrays* para detecção de CNVs, se tornou evidente no decorrer do projeto que o padrão dos SNPs obtido nos *arrays* revelava, a partir do DNA, informação valiosa sobre a estrutura dos cromossomos e a composição heterogênea de células em uma amostra (mosaicismo). Esses resultados são discutidos em detalhes em duas

situações: (1) A descrição de uma deleção terminal 1p36, associada a dissomia uniparental (UPD) em mosaico de segmentos de 1pter de diferentes tamanhos. Sugerimos que essa composição reflita eventos recorrentes de captura de telômero, embora processo similar nunca tenha sido descrito, e propomos um possível mecanismo responsável por originar esse desequilíbrio complexo. (2) Três dos nossos pacientes apresentam 4 cópias ou uma combinação de 3-4 cópias de segmentos proximais, na maior parte superpostos, de 15q11q13. Possíveis mecanismos de origem desses rearranjos são discutidos.

Palavras-chave: deficiência intelectual, CNV, diagnóstico, SNP array, mecanismo.

ABSTRACT

Intellectual disability (ID) is a complex and heterogeneous condition affecting about 1–3% of the general population. Chromosomal imbalances and copy-number variations (CNVs) have been recognized as the most frequent causes of ID and, until recently, most of these imbalances were diagnosed by cytogenetic analysis. Before the application of microarray analysis (CMA), the underlying cause of ID remains unknown in ~60% of patients. The use of CMA has revolutionized the diagnosis of ID and several other congenital disorders, and have made it possible to identify pathogenic CNVs that could explain the molecular etiology of ID. In developed countries, CMA is considered the first-tier technique for the analysis of patients with multiple congenital anomalies, ID, and/or autism spectrum disorders. However, in developing nations, detection of alterations is still performed mainly by conventional cytogenetic techniques. The aim of this study was identifying, using a high-density resolution SNP microarray, chromosomal imbalances in a total of 40 patients presented with moderate-to-severe ID, associated or not with dysmorphic features and congenital anomalies. Particularly, most of the patients in the cohort (~2/3) was not karyotyped previously. Although CMA has been recommended as the first-tier test since 2010 all over the world, the majority of the patients in the reported studies were karyotyped before CMA was offered as a diagnostic test. Rare CNVs were detected in 18 patients (45%). Among those patients, 12 (30%) carried pathogenic CNVs. This yield is much higher than reported in the literature (~20%), and possible causes for this discrepancy are discussed. Six patients (15%) carried variant of unknown significance (VUS). Furthermore, mechanisms involved in structural rearrangements found in some patients were investigated. Even though the main focus of this dissertation was the detection of CNVs using high resolution SNP arrays, throughout the course of this project it was clear that the SNP patterns found could reveal crucial information about the structure of chromosomes and the heterogeneous composition of cells (mosaicism). Those results are discussed in detail in two situations: (1) One description of a terminal 1p36 deletion, associated with mosaic uniparental disomy (UPD) of different sized 1pter segments. We hypothesized that this composition reflects recurrent telomere capture events, although a similar

process has never been described so far, and proposed a possible mechanism responsible for originating this complex imbalance. (2) Three of our patients carried four copies or a four-three copies-combination of a proximal, partially overlapping, 15q11q13 segment. Possible mechanisms responsible for this complex rearrangement are discussed.

Keywords: intellectual disability, CNV, diagnostic, SNP array, mechanism

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: A distribuição normal do quociente de inteligência	3
Figura 2: Aspecto geral da metodologia de <i>array</i> CGH	23
Figura 3: Aspecto geral da metodologia de SNP <i>array</i>	26
Figura 4: Resultados do SNP <i>array</i> para o paciente 1	50
Figura 5: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 2	51
Figura 6: Resultados de SNP <i>array</i> do Paciente 3	52
Figura 7: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 4	53
Figura 8: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 5	54
Figura 9: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 6	55
Figura 10: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 7	56
Figura 11: Resultados do SNP <i>array</i> do Paciente 8	57
Figura 12: Resultados do SNP <i>array</i> (A e B) e FISH (C) para a Paciente 9	58
Figura 13: Resultados do SNP <i>array</i> (A e B) e FISH (C) para a Paciente 10	60
Figura 14: Resultados do SNP <i>array</i> (A e B) e FISH (C) para a Paciente 11	62
Figura 15: Resultados dos SNP <i>arrays</i> (A-D) e FISH (E) para o Paciente 12	64
Figura 16: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 13	66
Figura 17: Resultados do SNP <i>array</i> para a Paciente 14	67
Figura 18: Resultados do SNP <i>array</i> para a Paciente 15	68

Figura 19: Resultados do SNP <i>array</i> (A-B) e FISH (C-E) para o Paciente 16	69
Figura 20: Resultados do SNP <i>array</i> para o Paciente 17	71
Figura 21: Resultado do teste de SNP <i>array</i> do Paciente 18 (A-B)	73

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Evolução dos métodos análise global para identificação de diferentes classes de rearranjos cromossômicos	12
Tabela 2: Critérios utilizados para a interpretação clínica das CNVs	37
Tabela 3: Variações no número de cópias (CNVs) raras encontradas nos pacientes do presente estudo.	77
Tabela 4: Regiões de Homozigose (ROH) encontradas no Paciente 18.	77

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1: Distribuição das causas da deficiência intelectual. Porcentagens são baseadas em um estudo de 15.484 indivíduos do GreenwoodGenetic Center (USA). (Srivastava e Schwartz 2014)	5

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	
I.1	A deficiência intelectual	2
I.2	A etiologia da deficiência intelectual	5
a)	Causas ambientais	6
b)	Causas genéticas	6
	Aberrações cromossômicas	7
	Causas monogênicas	8
	<i>Autossômicas dominantes</i>	8
	<i>Autossômicas recessivas</i>	9
	<i>Ligadas ao X</i>	9
I.2	Citogenética convencional e molecular na detecção de alterações cromossômicas em pacientes com DI	10
I.2.1	O início da citogenética humana	13
I.2.2	Bandamento cromossômico	14
I.2.3	FISH e o início da citogenética molecular	16
I.2.4	<i>Arrays</i> genômicos	19
I.2.4.1	<i>Array</i> CGH	20
I.2.4.2	SNP <i>array</i>	24
I.3	<i>Copy Number Variation</i> (CNV)	27
	Consequências biológicas das CNVs	30
	Interpretação das CNVs: relevância clínica	32
	CNVs e a deficiência intelectual	38
	JUSTIFICATIVA	40
II.	OBJETIVOS	41
III.	PACIENTES E MÉTODOS	
III.1	Pacientes	43
III.2	Métodos	43
III.2.1	Coleta de saliva e/ou sangue para extração de DNA genômico	43
III.2.2	SNP <i>array</i> e interpretação dos resultados	44
III.2.3	Análise citogenética e FISH	

a)	Cultura de linfócitos (modificada de Moorhead et al. 1960)	46
b)	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (<i>Fluorescence in situ hybridization</i> - FISH)	46
III.3	Financiamento	47
IV.	RESULTADOS	
	Paciente 1	49
	Paciente 2	50
	Paciente 3	51
	Paciente 4	52
	Paciente 5	53
	Paciente 6	54
	Paciente 7	55
	Paciente 8	56
	Paciente 9	57
	Paciente 10	59
	Paciente 11	61
	Paciente 12	63
	Paciente 13	64
	Paciente 14	66
	Paciente 15	67
	Paciente 16	68
	Paciente 17	70
	Paciente 18	71
VI.	DISCUSSÃO	
VI.1	SNP <i>arrays</i> e frequência de alterações cromossômica	79
VI.2	SNP <i>arrays</i> e a detecção de síndromes de microdeleção/microduplicação bem caracterizadas	83
VI.3	Outras CNVs patogênicas	89
VI.4	Alterações de significado incerto	90
VI.5	SNP <i>arrays</i> na elucidação de estruturas cromossômicas e mosaicismo	94
	ARTIGO 1	96
	Repetitive telomere capture as a novel mechanism for	

stabilizing a human 1p36 terminal deletion resulting in extensive mosaicism within and between tissues of the same patient.

ARTIGO 2

Trisomy and tetrasomy of chromosome 15q11q13 identified by SNP array in three idiopathic intellectual disability patients 114

V. CONCLUSÕES 129

Referências 130

Anexos

I) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 150

II) FICHA DE ANAMNESE 152

Introdução

I. INTRODUÇÃO

I.1 A deficiência intelectual

A deficiência intelectual (DI), previamente referida como retardo mental (Schalock et al. 2007; Salvador-Carulla e Bertelli 2008; Salvador-Carulla et al. 2011), é uma manifestação variável e heterogênea de uma disfunção do sistema nervoso central, sendo originada antes dos 18 anos de idade. É caracterizada por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, que compreende muitas das habilidades sociais e práticas (American Association on Intellectual and Developmental Disabilities 2014).

A DI, classicamente, é diagnosticada em crianças maiores de cinco anos, quando é possível mensurar a inteligência de forma sistemática por meio de testes que medem o quociente de inteligência (QI). Antes disso, é mais adequado caracterizar o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), que pode ou não refletir DI. O ADNPM pode ser definido como um atraso significativo em dois ou mais domínios do desenvolvimento, que correspondem ao nível da motricidade, da fala/linguagem, da cognição, das competências pessoais e sociais e das atividades da vida diária (Shevell et al. 2003).

Comumente, a função cognitiva é definida pelo QI do indivíduo. A inteligência segue uma distribuição normal refletindo um padrão de herança multifatorial (Figura 1). Em testes de QI, um dos critérios utilizados é a idade ajustada que dá uma distribuição normal com média de 100 e um desvio padrão de aproximadamente 15 unidades. Níveis de QI maiores do que dois desvios-padrão abaixo da média, ou seja, abaixo de 70, são considerados indicadores de DI. Sendo assim, a gravidade da condição pode ser posteriormente categorizada como *borderline* (QI 71–85), leve (QI 50–70), moderado (QI 35–50), grave (QI 20–35) e profundo (QI <20) (Regan e Willat 2010). Embora uma criança com uma escala abaixo de dois desvios padrões na média de QI provavelmente apresente algum grau de deficiência, o diagnóstico não é feito apenas baseado no QI. Tanto funcionamento adaptativo

inadequado quanto baixa pontuação em avaliação de QI são requeridos para um diagnóstico mais completo da DI (Weddell et al, 2011).

Figura 1: A distribuição normal do quociente de inteligência. A média da distribuição (μ) é o número que fica diretamente abaixo do pico da curva. O desvio-padrão da distribuição (σ) é a distância da média para os números diretamente abaixo dos pontos de inflexão da curva. Nos testes de QI, a média é 100 e o desvio padrão é de 15 unidades (Regan e Willat 2010).

Outra distinção clássica subdivide a DI em formas síndrômicas (DIS) e não síndrômicas (DINS) (Basel-Vanagaite 2007). Na forma síndrômica, a DI é acompanhada de um ou múltiplos aspectos clínicos ou comorbidades. Enquanto a síndrômica tem uma definição clara, existe um debate sobre a classificação da não síndrômica. Tradicionalmente, a DINS tem sido definida pela presença de DI como o único aspecto clínico. Contudo, tem sido um grande desafio eliminar a presença de problemas neurológicos mais sutis e doenças psiquiátricas nesses pacientes, embora eles possam ser menos aparentes ou difíceis de se diagnosticar devido ao problema cognitivo (Ropers 2006; Kaufman et al. 2010). Adicionalmente, dismorfismos ou características menores podem ser avaliados como variações individuais e só são associados a uma forma específica de DI quando vários pacientes são observados.

A DI é uma das doenças do desenvolvimento mais comuns; todavia, dada a heterogeneidade de suas causas, incluindo fatores ambientais, estimativas de sua prevalência no mundo são altamente variáveis (Chiurazzi e

Pirozzi 2016). Adicionalmente, a variação na estimativa também pode ser causada por diferenças no desenho experimental do estudo, pela população estudada e pela definição de DI (Willemssen e Kleefstra 2014).

Harris (2005) reportou que a prevalência da DI pode variar entre 1% e 3%, globalmente, e a prevalência da DI leve, moderada, grave e profunda, correspondem a cerca de 8%, 10%, 4% e 2% da população, respectivamente. Maulik e colaboradores (2011), através de uma meta-análise de mais de 50 trabalhos publicados no mundo, estimaram uma prevalência mundial de, aproximadamente, 1% da DI. Além disso, como documentado em vários estudos, a prevalência tende a ser maior em países em desenvolvimento (Durkin et al. 2000; Durkin 2002; Ropers 2008). No Brasil, segundo o Censo de 2010, 2,6 milhões (1,4% da população brasileira) apresentam deficiência intelectual (IBGE 2010). Esses números provavelmente representam uma subestimativa, uma vez que estão abaixo até mesmo de valores encontrados nos países desenvolvidos.

Como rotina, ao menos em países desenvolvidos, pacientes que apresentam ADNPM ou DI são submetidos a um amplo espectro de testes diagnósticos, incluindo exames físicos e morfológicos, investigações clínicas metabólica e neurológica, neuroimagem e testes genéticos (Curry et al. 1997; Hunter 2000; Rauch et al. 2006). A identificação precoce da etiologia genética é de grande importância ao paciente e à família. Primeiro, dará opções otimizadas de tratamento e permitirá um *screening* pré-sintomático para complicações associadas à doença. Segundo, o prognóstico aproximado pode ser inferido em parte dos casos, permitindo assistência e suporte educacionais adequados. Terceiro, uma estimativa de risco de recorrência na prole dos genitores ou de outros parentes, no contexto do aconselhamento genético, pode ser dada e a identificação de portadores bem como o diagnóstico pré-natal podem se tornar disponíveis. Quarto, a família pode ser encaminhada a serviços médicos e sociais apropriados e a grupos de apoios. E, por fim, o reconhecimento da etiologia eliminará testes adicionais que vão consumir

tempo e dinheiro (Hunter 2000; Shevell et al. 2003; Rauch et al. 2006; Hochstenbach et al. 2009).

I.2 A etiologia da deficiência intelectual

A história natural da DI é, geralmente, um curso estável de uma dificuldade de cognição apresentada no início da infância, como aquisição tardia da fala e outros domínios cognitivos, e persistindo até a fase adulta com graus variáveis de funcionamento mental. Alternativamente, a DI pode seguir um curso progressivo, característico de doenças neurodegenerativas, onde a perda das tarefas cognitivas se segue a um período de desenvolvimento normal (Anazi et al. 2016).

As causas da DI são extremamente heterogêneas, podendo ocorrer devido a fatores ambientais ou genéticos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição das causas da deficiência intelectual. Porcentagens são baseadas em um estudo de 15.484 indivíduos do *Greenwood Genetic Center* (USA). (Srivastava e Schwartz 2014).

a) Causas ambientais

O papel etiológico dos fatores ambientais é bem conhecido: agentes infecciosos (por exemplo, citomegalovírus, vírus da rubéola, *Trichomonas*, etc) ou substâncias tóxicas (tais como álcool ou exposição ao chumbo), eventos perinatais (tais como hemorragia periventricular em extrema pré-maturidade, ou hipóxia-isquemia na gestação pré-termo) ou eventos pós-natais (por exemplo, meningite e trauma cerebral). Estes eventos acontecem em menos do que 15% dos casos de DI, muito frequentemente sendo revelados por uma anamnese e um exame clínico completo (Chelly et al. 2006; Ropers 2008; Miclea et al. 2015; Chiurazzi e Pirozzi 2016). No entanto, crianças com problemas de desenvolvimento têm uma frequência aumentada de problemas durante o parto e a distinção entre causa e consequência não é sempre evidente.

b) Causas genéticas

Durante as últimas décadas, progresso significativo tem sido feito na elucidação dos fatores genéticos que acarretam a DI. (Xu e Chen 2003). Doenças mendelianas, aberrações cromossômicas ou fatores ambientais podem agir isoladamente ou em combinação. É difícil obter uma estimativa acurada da contribuição das anomalias citogenéticas à DI porque os estudos podem variar em diversos parâmetros, tais como critério de seleção dos indivíduos e sensibilidade de detecção dos métodos citogenéticos (Xu e Chen 2003).

A contribuição das diferentes causas da DI também parece ser distinta de acordo com a sua gravidade: casos de DI moderada a grave decorrem mais frequentemente de uma causa única maior, enquanto os casos de DI leve são mais frequentemente associados a origem multifatorial. Doenças genéticas e cromossômicas são responsáveis por 30-40% dos casos de DI moderada a grave (Xu e Chen 2003).

✓ Aberrações cromossômicas

Entre as causas genéticas de DI, aberrações cromossômicas (microscópicas e submicroscópicas) são uma das mais importantes e respondem por até 25% dos casos (Moeschler et al. 2014; Srivastava e Schwartz 2014; Miclea et al. 2015).

As aberrações microscopicamente visíveis podem ser detectadas em até 14% dos casos, das quais a trissomia do 21 é a mais frequente, correspondendo a aproximadamente 8% (Willemssen e Kleefstra 2014).

Outras anomalias cariotípicas associadas à DI são: trissomias do 13 e do 18, monossomia do X e aberrações cromossômicas estruturais, incluindo microdeleções (principalmente das regiões 1p36; 2q37, 4p16, 5p15, 7q11.2, 8p23.1, 8q23q24, 9q34.3, 11p13, 11p11.2, 15q11.2, 15q11.2, 16p13.3, 17p13.3, 17p11.2, 17q12, 17q21.3, 18q23, 22q11.2, 22q13) (Miclea et al. 2015).

Anomalias cromossômicas não balanceadas em regiões subteloméricas podem ser particularmente difíceis de visualizar citogeneticamente, utilizando bandamento G. Uma variedade de estudos usando sondas subteloméricas específicas revelou tais deleções. Em 1995, Flint e colegas usaram sondas de FISH subteloméricas para triar 99 pacientes com DI idiopática e sugeriram que essas deleções eram responsáveis por 6% dos casos. Posteriormente, a aplicação da técnica de *array* CGH (aCGH) trouxe vantagens devido à triagem de alta resolução e a aquisição de dados genômicos globais. Em 2002, Veltman e colaboradores examinaram por aCGH 20 pacientes sabidamente portadores de desequilíbrios teloméricos e encontraram, não apenas uma concordância com o diagnóstico citogenético, mas também rearranjos teloméricos adicionais em 3 dos 20 pacientes (Veltman et al. 2002).

Com o uso de *array*-CGH, também deleções e duplicações intersticiais, submicroscópicas (emergiram como causa importante na DI (Battaglia e Carey 2003; Ropers 2008, 2010). Adicionalmente, a detecção em vários estudos

dessa variação no número de cópias de sequências de DNA (*copy number variants* - CNVs) associada à DI contribuíram e continuam a contribuir com a descoberta de muitos genes que causam a DI (Kaufman et al. 2010).

✓ Causas monogênicas

Autossômicas dominantes

A identificação de genes autossômicos dominantes e que causam DI é difícil, devido à falta de casos familiares, já que indivíduos afetados raramente irão se reproduzir. Por isso, a maioria das formas de DI autossômica dominante (DIAD) são devidas a mutações *de novo* (Basel-Vanagaite 2008; Ropers 2008). Contudo, sérias mutações dominantes podem ser transmitidas, sendo responsáveis por formas familiares, quando a mutação exibe penetrância reduzida e/ou expressividade variável, dependendo dos efeitos de interação com fatores ambientais e genéticos (Maris et al. 2013). Exemplos bem conhecidos de DI dominante familiar ocorrem na neurofibromatose do tipo 1 (incidência de 1/4000) e na esclerose tuberosa complexa (incidência de 1/6000), que pode tanto ter uma expressão muito leve ou causar DI (Maris et al. 2013).

Atualmente, estudos utilizando sequenciamento de exoma têm sido feitos para identificar mutações *de novo* em síndromes reconhecidas clinicamente (de Ligt et al. 2012; Willemsen e Kleefstra 2014). Estudos sugerem que em populações não consanguíneas, mutações *de novo* em genes autossômicos expressos no cérebro são surpreendentemente comuns em DI idiopática (Ropers 2008).

Autossômicas recessivas

Atualmente, mais de 300 genes foram identificados como causadores de formas de DI autossômica recessiva (DIAR), principalmente, utilizando-se SNPs para mapear regiões de homozigose e, subsequente, triagem de genes candidatos por sequenciamento Sanger (Vissers et al. 2016). Muitos estudos evidenciaram a consanguinidade parental como um importante fator de risco para a DI, relacionada a uma reduzida performance cognitiva (Kahrizi et al. 2011; Willemsen e Kleefstra 2014)

Em combinação com o mapeamento de regiões de homozigose, o sequenciamento de exoma tem se mostrado uma boa ferramenta para a identificação de genes de DIAR (de Ligt et al. 2012; Willemsen e Kleefstra 2014).

Ligadas ao X

Cerca de 10% da DI em homens é causada por genes ligados ao X (DILX) (Ropers 2008). Grande número de genes (mais de 100) que ocasionam DI já foram identificados no cromossomo X (Willemsen e Kleefstra 2014) e isso parece explicar parte da proporção maior de DI em homens (Männik et al. 2015).

O gene *FMR1*, que causa a síndrome do X Frágil, é a segunda causa mais comum de DI, após trissomia do 21, com prevalência de 0,5 a 3% (van Karnebeek et al. 2005; Basel-Vanagaite 2008; Willemsen e Kleefstra 2014).

Estudos de ligação para identificar o gene causativo em famílias com DILX podem ser utilizados quando poucos indivíduos afetados com o mesmo fenótipo são diagnosticados, usando somente marcadores do cromossomo X, que reduzem significativamente o trabalho envolvido. Mais de 50 e 25 genes identificados estão associados com a DILX síndrômica (DILX-S) e não síndrômica (DILX-NS), respectivamente (Basel-Vanagaite 2008).

Utilizando-se aCGH de alta resolução, Whibley e colaboradores (2010) identificaram CNVs patogênicas em 10% das famílias com evidência de DILX, com mutações variando de 2kb a 11 Mb. Adicionalmente, o sequenciamento de todas as regiões exônicas, por sequenciamento de próxima geração, pode explicar até 70% dos casos de DILX (Willemsen e Kleefstra 2014).

I.2 Citogenética convencional e molecular na detecção de alterações cromossômicas em pacientes com DI

Técnicas citogenéticas convencionais e moleculares (bandeamento G, FISH subtelomérico ou *targeted*, etc) desempenharam nas últimas décadas um importante papel na avaliação de indivíduos com DI ou atraso no desenvolvimento, anomalias congênitas e aspectos dismórficos. A introdução da técnica de FISH permitiu a detecção de microdeleções/microduplicações em pacientes com síndromes reconhecidas clinicamente, tais como as síndromes de Prader-Willi e Angelman, e a síndrome de Williams, além de CNVs subteloméricas. A aplicação dessas técnicas levou à identificação de um diagnóstico molecular em 6 a 10% dos casos (Moog 2005; Ropers 2008; Willemsen e Kleefstra 2014). A subsequente introdução de *microarrays* genômicos permitiu a detecção de CNVs submicroscópicas com uma resolução similar ou maior que FISH, porém, examinando o genoma inteiro de uma vez, o que levou à identificação de novas síndromes de microdeleção/microduplicação, que previamente escaparam da detecção pelas técnicas de citogenética convencional ou FISH (Crotwell e Hoyne 2012; Willemsen e Kleefstra 2014).

Mesmo após a introdução dos *array* genômicos como primeira linha de investigação (Miller et al. 2010), a causa ainda permanece desconhecida em 30-50% dos casos de DI moderada a grave e na maioria dos casos de DI leve, limitando a eficiência do aconselhamento genético, da detecção dos portadores e do diagnóstico pré-natal dessas famílias (Flint e Knight 2003; Kriek et al. 2004).

Adicionalmente, novos métodos baseados em FISH, PCR e *arrays* de DNA têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados para tentar aumentar a porcentagem de detecção nos casos de DI de causa desconhecida (Tabela 1) (Flint e Knight 2003; Lee 2013; Koolen et al. 2004; Baroncini et al. 2005; Bartnik et al. 2014).

Técnicas	Detecção				Resolução	Sensibilidade
	Deleções e Duplicações	Inserções	Eventos <i>copy-neutral</i>			
			Rearranjos balanceados	ROH e UPD		
<i>Cariotipagem/Bandamento G</i>	Sim	Sim	Sim	Não	Baixa (> muitos Mb)	Baixa
<i>FISH</i>						
Bibliotecas de DNA (incluindo <i>multicolor FISH</i>)	Sim	Sim	Sim	Não	Baixa (> muitos Mb)	Alta
<i>FISH de sonda única</i>	Região candidata	Região candidata	Região candidata	Não	Alta (poucos Kb)	Alta
<i>Array CGH</i>						
1Mb BAC <i>array CGH</i>	Sim	Não	Não	Não	Média (~ 1 Mb)	Alta
Tiling path BAC <i>array CGH</i>	Sim	Não	Não	Não	Alta (>50-100 Kb)	Alta
Array CGH de oligonucleotídeos	Sim	Não	Não	Não	Alta (>300 Kb)	Alta
<i>SNP array</i>						
SNP <i>array</i>	Sim	Não	Não	Sim	Alta (>5-10 Kb)	Alta
Sequenciamento de próxima geração	Potencialmente sim	Sim	Potencialmente sim	Sim	Muito Alta (nível de pb)	Alta

Tabela 1: Evolução dos métodos análise global para identificação de diferentes classes de rearranjos cromossômicos. Abreviaturas: ROH - regiões de homozigose; UPD dissomia uniparental; BAC - cromossomo artificial bacteriano (Modificado de Scouarnec e Gribble 2011).

I.2.1 O início da citogenética humana

O início do estudo da citogenética humana é geralmente atribuído a Walter Flemming, um citologista austríaco e professor de anatomia, que publicou as primeiras ilustrações do cromossomo humano em 1882. Flemming também se referiu à porção “corável” do núcleo como cromatina e foi o primeiro a usar o termo mitose. No final do século 19, em 1888, Waldeyer introduziu o termo “cromossomo”, que significa “corpo colorido” (do grego *chroma*, que significa cor, e *soma*, que significa corpo). Após a “redescoberta” dos estudos de mecanismos de herança Mendeliana em 1900, Sutton, estudando espermatogênese de gafanhotos, e Boveri, investigando reprodução em ouriços do mar desenvolveram a teoria cromossômica de herança, que resultou na combinação das disciplinas de citologia e genética (Revisão em Smeets 2013).

Os desafios técnicos enfrentados pelos pesquisadores no campo da citogenética foram numerosos. Até 1950, avanços significativos nos métodos de preparação cromossômica ocorreram, como melhora nas técnicas de cultura celular, o uso de solução hipotônica para facilitar a dispersão dos cromossomos, e o uso da colchicina (um inibidor da formação do fuso mitótico), (Revisão em Dolan 2016). Tjio e Levan (1956), usando uma cultura de células embriônicas, foram os primeiros pesquisadores a mostrar o número correto de cromossomos humanos como 46. Em décadas anteriores a essa descoberta, o número de cromossomos humanos foi descrito em muitos estudos como 48 (revisão em Gartler 2006).

Embora somente poucos detalhes cromossômicos fossem conhecidos durante a era pré-bandamento, os cromossomos podiam ser arranjados em diferentes grupos baseados no seu tamanho e posição dos centrômeros - o que levou a organizar os cromossomos em sete grupos, designados de A-G (Hamerton 1967).

Três anos após os estudos de Tjio e Levan, a descoberta de um cromossomo 21 extra em pacientes com síndrome de Down marcou o início da

aplicação clínica dos estudos cromossômicos (Lejeune et al. 1959). Outras síndrome relacionadas a trissomias foram identificadas subsequentemente, incluindo as dos cromossomos 18 (Edwards et al. 1960), 13 (Patau et al. 1960) e, mais tardiamente, 8 (de Grouchy et al. 1971) e 22 (Iselius et al 1983). Além de aberrações autossômicas, aberrações numéricas associadas aos cromossomos sexuais também foram descritas, tais como 45,X na Síndrome de Turner (Ford et al. 1959), 47,XXY na síndrome de Klinefelter (Jacobs e Strong 1959). Em todos esses casos, a análise cromossômica foi feita utilizando-se medula óssea ou cultura de fibroblastos (Ferguson-Smith 2015). Todavia, a técnica foi suficiente para detectar a primeira alteração estrutural associada a leucemia mielóide crônica, que parecia ser uma pequena deleção no braço longo do cromossomo 22 (Cromossomo Filadélfia) (Nowell e Hungerford 1960).

I.2.2 Bandamento cromossômico

Até o início da década de 1970, os estudos citogenéticos eram feitos em cromossomos marcados com coloração sólida, o que dificultava uma identificação inequívoca dos cromossomos individuais e a detecção de muitas aberrações cromossômicas. Consequentemente, muitos esforços foram feitos para desenvolver uma técnica capaz de discriminar claramente os pares de cromossomos (Smeets 2004).

Em 1970, Torbjorn Caspersson desenvolveu um protocolo de coloração que produzia padrões altamente reprodutíveis de bandas claras e escuras ao longo do comprimento do cromossomo (Caspersson et al. 1970). O padrão de bandamento é altamente característico de cada cromossomo e facilita a completa identificação do cariótipo humano. Estes padrões se tornaram o código de barras com os quais os citogeneticistas podiam facilmente identificar os cromossomos, detectar deleções, inversões, inserções, translocações, sítios frágeis e outros rearranjos mais complexos, além de refinar sítios de quebra.

A técnica desenvolvida por Caspersson, chamada de bandamento Q, foi a primeira a ser aplicada em vários laboratórios; desde então, outras técnicas de bandamento surgiram, tais como as de bandamento G, R, C, NOR, entre outras, tendo as suas específicas propriedades e aplicações (Smeets 2004; Riegel 2014). Para o uso na rotina do ambiente clínico, o bandamento G, baseado na aplicação de tripsina seguida por Giemsa, tornou-se o método mais aceito no mundo (Trask 2002; Kosyakova et al. 2009).

Adicionalmente, a partir de 1960, uma nomenclatura internacional para a designação das várias bandas e colorações dos cromossomos humanos foi estabelecida e resultou no primeiro sistema internacional para a nomenclatura da citogenética humana (ISCN) (Jacobs 1972). Desde então, novas versões contendo modificações ou incrementos devidos a introdução de técnicas novas foram periodicamente publicadas, a última atualização publicada em 2016.

Uma significativa melhora no padrão de bandamento aconteceu quando, em 1976, Yunis desenvolveu o bandamento de alta resolução (Yunis 1976). Ao sincronizar culturas de linfócitos, ele significativamente aumentou o número de células em pró-metáfase ou mesmo em prófase, ao invés de metáfase. Nesses cromossomos mais esticados, houve um aumento na resolução de 500 a 1000 bandas por genoma haploide (Smeets 2004). Isto tornou viável não só uma descrição precisa de aberrações cromossômicas já conhecidas, mas também facilitou a detecção de aberrações sutis, tais como duplicações ou deleções menores. Ao aplicar esta técnica, muitas síndromes clínicas já bem conhecidas puderam ser correlacionadas a pequenas aberrações cromossômicas e, assim, os conceitos de microdeleção e síndromes de genes contíguos se estabeleceram (Schmickel 1986; Smeets 2004).

A citogenética clássica se tornou uma ferramenta de diagnóstico poderosa para a detecção de alterações cromossômicas, incluindo ganhos e perdas de segmentos genômicos e rearranjos cromossômicos. Infelizmente, mesmo com 500-1000 bandas por genoma haplóide (Smeets 2004), a resolução da análise de bandamento é limitada a rearranjos que envolvam >3 Mb de DNA (Kearney 2001; Riegel 2014). Adicionalmente, embora

desequilíbrios genômicos tão pequenos quanto 3 Mb sejam eventualmente detectados, desequilíbrios genômicos entre 5 e 10 Mb frequentemente não são detectados, dependendo da região envolvida e/ou das condições do ensaio. Se pacientes que apresentam Síndrome de Down forem excluídos da análise, o bandamento G de pacientes com DI identifica anomalias em menos do que 3% dos indivíduos. Além disso, a técnica está propensa a um grau considerável de variação dependendo dos laboratórios e dos citogeneticistas envolvidos (Miller et al. 2010).

I.2.3 FISH e o início da citogenética molecular

Apesar do estabelecimento das técnicas de bandamento de alta resolução, que permitiu revelar muitas síndromes genéticas desconhecidas, em muitos casos, a causa da DI continuava desconhecida e supunha-se que aberrações submicroscópicas fossem responsáveis por parte dos casos (Durmaz et al. 2015).

A hibridação *in situ* é uma metodologia que permite sequências de ácidos nucleicos sejam examinados no local de complementaridade da sequência nos cromossomos e foi descrita em 1969, usando sondas radioativas (Gall e Pardue 1969). A marcação de sondas não radioativas, tal como a biotina detectada por avidina acoplada a um fluorocromo, foi descrita em 1981 (Langer et al. 1981); originando a hibridação *in situ* fluorescente (FISH - *fluorescence in situ hybridization*); essa técnica foi aplicada em 1986 pela primeira vez em humanos (Pinkel et al. 1986).

A metodologia é baseada no princípio de hibridação complementar de uma sonda de DNA que é marcada diretamente com um fluorocromo (rodamina, fluoresceína-5-tiocianat, etc) ou indiretamente através de haptenos (biotina ou digoxigenina) (Dutta 2016). A hibridação *in situ* fluorescente permite identificar regiões específicas do DNA e, dessa forma, elucidar aberrações que

não podiam ser detectadas por técnicas de bandamento convencional, mesmo ao nível de gene (McNeil e Ried 2000).

O advento da hibridação *in situ* fluorescente gerou uma segunda revolução na análise citogenética. Primeiro, o uso de bibliotecas de sondas específicas para cada cromossomo (pintura cromossômica) permitiu a identificação inequívoca do material cromossômico envolvido em rearranjos complexos. Segundo, o projeto Genoma Humano gerou uma variedade de sondas *loci* específicas que não somente impulsionaram as estratégias de mapeamento de genes, mas também levaram à identificação consistente de pontos de quebras de translocações e à delimitação de regiões críticas deletadas (Kearney 2001).

FISH pode ser feito em uma variedade de alvos, incluindo RNA, DNA em preparações de cromossomos metafásicos obtidos de células mitóticas ou DNA em núcleo interfásico. FISH não é apenas utilizado em aplicações de diagnóstico clínico, mas também é amplamente usado na pesquisa científica, incluindo mapeamento físico, estudos de processos biológicos, tais como replicação de DNA, processamento de RNA e expressão gênica, e estudos de evolução cromossômica, incluindo conservação de sequências e rearranjos cromossômicos entre espécies (Tsuchiya et al. 2009).

As sondas utilizadas em experimentos de FISH podem ser divididas em três tipos, cada uma com diferentes aplicações: sondas de pintura cromossômica, sondas de sequência repetitiva e sondas *loci* específicas (também conhecidas como sondas de cópia única). Sondas de pintura cromossômica são conjuntos de sondas (bibliotecas) que marcam todo o cromossomo ou uma região dele, e identificam a origem de um segmento cromossômico. Sondas de sequência repetitiva se hibridam em *loci* que contenham sequências presentes em muitas cópias. Como exemplo temos as sondas pan-teloméricas (que hibridam em sequências repetidas [TTAGGG] presentes em todas as regiões terminais cromossômicas) e as sondas centroméricas (cujo alvo são as sequências alfa e beta satélites, que flanqueiam os centrômeros humanos). O terceiro tipo de sonda, as sondas *loci*

específicas, são usualmente clones genômicos que variam no tamanho dependendo da natureza do vetor de clonagem (desde plasmídeos até PAC, YAC e BAC). Essas sondas são particularmente úteis na identificação de regiões específicas nos cromossomos e clinicamente usadas para a detecção de síndromes de genes contíguos ou síndromes de microdeleção/microduplicação, e rearranjos estruturais, tais como translocações e inversões (Dave e Sanger 2007; Bishop 2010).

Os métodos citogenéticos convencionais (bandamento cromossômico e cariotipagem) são muito informativos e ainda comumente utilizados. Contudo, essas técnicas são limitadas à detecção de alterações cromossômicas numéricas (aneuploidia, poliploidia) e variantes estruturais microscópicas de alguns megabases de tamanho (Tabela 1). Os métodos citogenéticos moleculares permitiram a detecção de variantes estruturais submicroscópicas e foram cruciais para estudar os rearranjos complexos, gerados por mais de dois eventos de quebras cromossômicas, refinar os pontos de quebra e fazer comparações entre espécies (Le Scouarnec e Gribble 2012).

A técnica de FISH também apresentou uma vantagem adicional, já que pode ser utilizada em células interfásicas e dispensa células em divisão, e permite resultados rápidos de detecção de aneuploidias, translocações balanceadas, análises *single-cell* (diagnóstico de pré-implantação) e secções de parafina (Martin e Warburton 2015)

FISH representou um importante avanço na detecção confiável de pequenos rearranjos cromossômicos e permitiu que os geneticistas rapidamente confirmassem o diagnóstico de uma síndrome de microdeleção ou de microduplicação suspeita em um paciente. A técnica também permitiu a investigação de deleções e duplicações subteloméricas, que foram consideradas com a causa de 2,5 a 5% dos casos de DI idiopática (Ravnan et al. 2006).

FISH é uma técnica flexível que permitiu abordagens diversas. Há múltiplas abordagens usando FISH para diferentes aplicações, por exemplo.

reverse-FISH , *fiber*-FISH, M-FISH ou *multicolor* FISH, SKY, *flow*-FISH, Q-FISH, COBRA-FISH, cenM-FISH, CGH entre outros (Riegel 2014).

Com o mapa acurado do genoma humano obtido pelo Projeto Genoma Humano, mais sondas de segmentos clonados e mapeados (cosmídeos, PAC's, BAC's e YAC's) se tornaram disponíveis para fins de diagnóstico e pesquisa (Cheung et al. 2001; Durmaz et al. 2015). Por causa desses estudos, muitos testes diagnósticos clínicos baseados em FISH se tornaram comercialmente disponíveis.

Como em muitos casos, desequilíbrios genômicos podem ser o resultado de uma (pequena) translocação não balanceada entre dois cromossomos, possivelmente herdada de um portador balanceado (Smeets 2004). Muitos estudos foram feitos com FISH usando sondas subteloméricas e mostraram que aproximadamente 6% dos pacientes portadores de deficiência intelectual idiopática apresentavam uma deleção ou duplicação de alguma região terminal (Flint et al. 1995; Knight et al. 1999); esses dados eram sugestivos de que aberrações submicroscópicas intersticiais também poderiam estar presentes no genoma em pacientes com DI idiopática em uma frequência maior do que se pensava anteriormente (Durmaz et al. 2015).

Como avaliar rearranjos cromossômicos em todo o genoma utilizando-se FISH era caro e laborioso, novas técnicas foram exploradas e, finalmente, a hibridação genômica comparativa, inicialmente usando cromossomos como alvo (Kallioniemi et al, 1992), foi desenvolvida; posteriormente, a substituição dos cromossomos em metáfase por sondas de localização conhecida levaram ao desenvolvimento dos *arrays* genômicos (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998; Albertson e Pinkel 2003)

I.2.4 Arrays genômicos

Os microarranjos (*arrays*) genômicos são uma ferramenta utilizada para a detecção de deleções e duplicações genômicas (Dave e Sanger 2007). Esta

é uma técnica que permite uma triagem de todo o genoma, de regiões específica genéticas de interesse, incluindo regiões cromossômicas subteloméricas, que têm sido relacionadas a muitos casos de deficiência intelectual (Flint et al. 1995; Knight et al. 1999; Wu et al. 2010; Szabó et al. 2012).

A investigação baseada em *arrays* genômicos não depende da disponibilidade de células vivas em divisão e, conseqüentemente, pode produzir resultados quando a rotina de metáfases não é possível, como no caso do estudo de tumores. Sobretudo, a resolução dos arrays depende apenas da distância entre as sondas, potencialmente com resolução muito maior que a citogenética clássica, revelando deleções e duplicações submicroscópicas.

I.2.4.1 Array CGH

A hibridação genômica comparativa (*comparative genomic hybridization* - CGH) usava cromossomos metafásicos como alvo, e foi o primeiro *array* genômico produzido para detectar e mapear mudanças no número de cópias em milhares de sequências alvo no genoma; foi amplamente utilizada para análise de amostras de tumor e aberrações cromossômicas constitucionais, desde que foi reportada pela primeira vez por Kallioniemi e colaboradores, em 1992 (Kallioniemi et al. 1992).

A tecnologia de CGH compara o DNA a ser testado com uma amostra referência sem alteração. O DNA teste e a amostra referência são marcados com dois fluorocromos distintos, combinados e, então, hibridados na mesma lâmina. A intensidade relativa das duas fluorescências emitidas é comparada. Casos com duplicação terão um maior sinal de hibridação do DNA teste do que do referência, ao passo que casos com que apresentem deleção terão um sinal de hibridação menor do DNA teste do que do referência. Alguns anos depois, os cromossomos metafásicos foram substituídos por microarranjos de sondas

com mapeamento conhecido como alvo (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998; Albertson e Pinkel 2003), os chamados *array*-CGH (aCGH) (Figura 2) (Karampetsou et al. 2014). A técnica de aCGH utilizada permite a análise simultânea de centenas a milhares de *loci* discretos, o que não é possível em um único experimento de FISH, e em uma resolução muito maior do que as análises citogenéticas convencionais (Shaffer et al. 2007; Manning et al. 2010).

Arrays genômicos foram inicialmente desenvolvidos utilizando-se clones de BAC ou cosmídeos. Posteriormente, *arrays* de oligonucleotídeos foram desenvolvidos e, atualmente, são amplamente utilizados (Karampetsou et al. 2014). Sondas de oligonucleotídeos são de 50 a 60 pb (2.000 a 2.500 vezes menores do que sondas de BAC) e, assim, tem o potencial de gerar maior resolução à análise, que é dependente do número e espaçamento (densidade) das sondas, bem como o número de sondas consecutivas necessárias para distinguir de forma correta uma CNV. Enquanto que *arrays* de BAC's possuem uma razão sinal/ruído maior e, conseqüentemente, um único clone de BAC é suficiente para distinguir acuradamente a CNV, sondas de oligonucleotídeos menores resultam em uma hibridação menos específica e uma razão sinal/ruído menor. Para *arrays* de oligonucleotídeos, isto leva a um ensaio menos robusto e à necessidade de um maior número de sondas consecutivas para distinguir uma CNV de forma correta (Karampetsou et al. 2014). A resolução da análise de ganhos e perdas genômicas em geral, e em particular relacionados à DI, tornou-se muito maior (Pinkel et al. 1998; Bartnik et al. 2014; Kashevarova et al. 2014).

A partir de 2000, investigações com aCGH de nosso grupo (Krepischi-Santos et al. 2006; Rosenberg et al. 2006; Kriek et al. 2007) e de outros (Shaw-Smith et al. 2004; de Vries et al. 2005; Friedman et al. 2006; Menten et al. 2006) em indivíduos com deficiência intelectual idiopática mostraram que desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos eram responsáveis por 10-17% dos casos. Dessa forma, estudos têm mostrado um número significativo de CNV's patogênicas que não haviam sido detectadas por técnicas citogenéticas convencionais.

Baseado nesses resultados, o consórcio internacional ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* 2012) recomendou que *arrays* genômicos representassem a primeira linha de investigação citogenética nos casos de deficiência intelectual e anomalias congênitas idiopáticas (Miller et al. 2010; Lee et al. 2013). O grupo fez uma meta-análise de 33 artigos que incluíam mais de 21.000 pacientes testados por *arrays* genômicos e encontraram uma taxa de detecção entre 15-20% para os *arrays*, quando comparado aos 3% de taxa de detecção para o bandamento G (excluindo a síndrome de Down e outras síndromes cromossômicas reconhecíveis) (Miller et al. 2010).

Figura 2: Metodologia de *array* CGH: Os DNAs diferentemente marcados do paciente e da amostra referência são misturados e hibridados em uma lâmina de *microarray*, que apresenta sondas de mapeamento conhecido. O DNA se liga na sonda com sequência complementar, em proporção similar ao número de cópias presente na mistura. Após a hibridação, a lâmina é escaneada e a fluorescência em cada *locus* do genoma é medida. A intensidade relativa entre os dois fluorocromos é calculada para cada sonda. O *software* plota cada sonda de acordo com a posição genômica nos cromossomos (eixo X) e a razão das intensidades teste/referência (eixo Y). Uma razão de intensidade teste/referência igual a 1 (mesmo número de cópias em ambas as amostras) representa ausência de alteração, enquanto razões significativamente acima ou abaixo de 1 representam ganho ou perda, respectivamente, das sequências no DNA teste. (Modificado de Karampetsou et al 2014).

I.2.4.2 SNP arrays

Identificar variantes que contribuem para uma determinada doença é essencial para pesquisa e aconselhamento na genética humana. Localizar com precisão esses *loci* causais requer a habilidade de avaliar a variação da sequência do DNA em uma escala que abranja globalmente o genoma (LaFramboise 2009). O tipo mais comum de variação genética humana é o SNP (*single nucleotide polymorphism*), uma posição em que bases alternativas ocorrem em uma frequência apreciável (>1%) na população humana e grandes grupos de SNPs mapeados podem servir como ferramentas preciosas nos estudos de genética humana (Wang et al. 1998). É estimado que existam em torno de 10 milhões de SNPs no genoma humano (Kruglyak e Nickerson 2001).

A tecnologia de SNP array foi desenvolvida em 1998, para genotipagem (Wang et al. 1998). Os estudos foram inicialmente desenhados para o uso em estudos de associação de SNPs com fenótipos específicos. Posteriormente, o seu uso foi expandido para a detecção de desequilíbrios genômicos. Desde então, a técnica tem sido melhorada dramaticamente e se tornou uma das ferramentas de análise genômica mais poderosas (Figura 3).

Como a técnica é baseada em SNPs, cada *locus* na lâmina é representado por dois alelos, designados como A e B. Consequentemente, o genótipo de indivíduo normal no array será AA, AB ou BB (LaFramboise 2009). Dessa forma, SNP arrays analisam não somente a variação no número de cópias, mas também a informação genotípica em múltiplos *loci* polimórficos por todo o genoma (Schaaf et al. 2011).

Os SNP arrays da Affymetrix e da Illumina encontrados no mercado atualmente, apesar de usarem diferentes compostos químicos, possuem muitos aspectos em comum. Ambos se baseiam na hibridação do fragmento de fita simples do DNA aos arrays contendo centenas de milhares de sondas únicas. Em ambos os casos, escâneres e softwares podem produzir uma medida de intensidade de sinal associada a uma sonda após a hibridação. O princípio fundamental é que a intensidade do sinal depende da quantidade de

DNA na amostra teste, bem como a afinidade entre o DNA teste e a sonda. O extenso processamento e análise destas medidas de intensidade produz as inferências dos genótipos de SNPs e a estimativa do número de cópias de cada *locus* (LaFramboise 2009).

Há vantagens e desvantagens de metodologias baseadas em *arrays*, quando comparadas com a citogenética convencional referente à detecção de mosaicismo. Ao utilizar *arrays*, a média de muitos e diferentes tipos de células representadas na amostra de DNA são analisadas, além de células de todas as fases do ciclo celular serem avaliadas; adicionalmente, as amostras não precisam ser cultivadas, o que poderia causar desvio na proporção inicial das linhagens e mesmo introduzir nova mutação no material genético (Biesecker e Spinner 2013). Muitos estudos testaram a habilidade do aCGH em identificar mosaicismo, e foi demonstrado que esta técnica poderia identificar este evento quando as células variantes constituíam mais de 10% da população total de células. É importante notar que o bandamento G e FISH, embora mais trabalhosos, conseguem detectar mosaicismo muito abaixo desse limiar, quando número suficiente de células é analisado. Com relação aos SNPs *arrays*, este é mais sensível do que o aCGH para a detecção de mosaicismo quando desequilíbrio alélico é utilizado, e o mosaicismo envolvendo menos do que 5% das células pode ser detectado utilizando-se o SNP *array* (Conlin et al 2014).

Figura 3: Metodologia de SNP array. DNA do paciente é marcado usando um fluorocromo e subsequentemente hibridado a uma lâmina de *microarray*. Cada *spot* na lâmina representa um alelo A ou B para um *locus* específico no genoma. O DNA hibrida nas sondas com sequência complementar. Após a hibridação, a lâmina é escaneada por um aparelho que mede a fluorescência de cada sonda. A intensidade da fluorescência para cada *locus* e para cada alelo em um determinado *locus* é calculada. Um *locus* heterozigoto (AB) mostrará intensidade igual para ambos os alelos. Um alelo homozigoto (AA ou BB) mostrará maior intensidade para o alelo presente (A ou B). Informações sobre o número de cópias podem ser extrapoladas destes dados. O *software* de análise compara os dados a um arquivo de referência *in silico* e plota cada sonda ao longo do comprimento do cromossomo dependendo da sua localização e intensidade de fluorescência; também plota separadamente a frequência do alelo B (*B Allele Frequency* - BAF), de acordo com a proporção das intensidades de fluorescência dos alelos A e B. (Modificado de Karampetsou et al 2014).

Uma grande vantagem desta tecnologia sobre o *array* CGH e outros *arrays* que não usam SNPs é a sua capacidade para identificar regiões de homozigose (*regions of homozygosity* - ROH) no genoma (Gondek et al. 2008; Kearney et al 2011). Dependendo do contexto genômico, ROHs constitucionais podem indicar homozigose ancestral, dissomia uniparental (*uniparental disomy* - UPD) ou consanguinidade parental (Alkuraya 2010; Kearney et al 2011; Papenhausen et al 2011). Pequenas ROH (até 5 Mb) são consideradas marcadores ancestrais de cruzamentos entre as populações. A presença de uma grande ROH ou duas ROH no mesmo cromossomo pode indicar UPD, especialmente se a ROH for telomérica (Alkuraya 2010; Papenhausen et al 2011). Múltiplas ROH espalhadas por diferentes cromossomos são indicativas de consanguinidade parental (Papenhausen et al 2011; Schaaf et al 2011).

O uso desta ferramenta permite a avaliação simultânea do número de cópias para detectar os ganhos e perdas genômicos e UPD, em casos de isodissomia ou regiões isodissômicas secundárias a recombinação. No caso de heterodissomia, o diagnóstico de UPD pode ser avaliada por SNP *array* apenas se o DNA dos pais também for analisado (Conlin et al. 2010).

Atualmente, o SNP *array* é uma ferramenta bastante utilizada no diagnóstico de DI idiopática associada ou não a anomalias congênicas/malformações (Pani et al. 2010; Zhang et al. 2013; D'Amours et al. 2014; Utine et al. 2014; Bulayeva et al. 2015; Uehara et al. 2016); sendo que, em alguns casos, a taxa de detecção pode chegar até 20% (Pereira et al. 2015)

I.3 Copy Number Variation (CNV)

As variações de sequência de DNA podem abranger desde uma única base, tais como SNPs e mutações de ponto, passando por pequenas InDels, variantes estruturais, até grandes aberrações cromossômicas (Zhang et al. 2013). É cada vez mais evidente que o genoma humano difere mais em

número de bases como consequência da variação estrutural do que diferenças em pares de bases únicas (Alkan et al. 2011).

Variantes estruturais são definidas como alterações genômicas que envolvem segmentos de DNA maiores do que 1 kb e que podem ser microscópicas ou submicroscópicas (Feuk et al. 2006). Entre as variantes estruturais, encontram-se as CNVs (do inglês, *copy number variation*) que são segmentos de DNA presentes em número de cópias variável em comparação a um genoma de referência e/ou entre indivíduos (Feuk et al. 2006; Lee et al. 2007).

Em 2004, com o advento dos *arrays* genômicos, dois grupos, de forma independente, revelaram que CNVs são amplamente espalhadas no genoma humano e representam uma fonte significativa de variação genética (lafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004). Estes estudos foram seguidos pela conclusão do primeiro mapa de CNV do genoma humano (Redon et al. 2006).

lafrate e colaboradores (2004) utilizaram um *array* de BAC (distribuídos em intervalos de 1 Mb no genoma humano) para analisar 39 indivíduos não aparentados e identificaram 255 *loci* que continham desequilíbrios genômicos. A CNV mais comum perfazia o *locus* da amilase (região cromossômica 1p13.3) e um experimento de *fiber-FISH* mostrou que a região contendo este(s) gene(s) variava de 150 e 435 kb entre os diferentes indivíduos. Um ponto importante encontrado no estudo foi que 102 (41%) dessas CNVs foram observadas em mais do que um indivíduo, o que sugere que essas variações não são raras e podem representar variações polimórficas. Além disso, a análise do conteúdo genético das CNVs revelou que essas regiões genômicas não são lixo, mas incluem muitos genes funcionais envolvidos na regulação do crescimento celular e do metabolismo.

Já Sebat e colaboradores (2004), usando uma plataforma de *array* contendo 85 mil oligonucleotídeos espaçados a 35 Kb no genoma humano (técnica chamada de ROMA), encontraram 221 CNVs (das quais 76 eram raras) ao analisar um grupo de 20 indivíduos. Os autores encontraram CNVs

em 70 genes diferentes que incluíam aqueles envolvidos em funções neurológicas, regulação de crescimento celular e do metabolismo, e muitos outros genes associados a doenças.

Em média, 11 (Sebat et al. 2004) ou 12,4 CNVs (Iafrate et al. 2004) por indivíduo foram detectadas em cada um dos estudos. Esses dois estudos pioneiros mostraram evidência do impacto da variação de número de cópias de segmentos de DNA na variabilidade genética humana. Contudo, devido ao limitado número amostral, resolução das técnicas e cobertura genômica, as CNVs descobertas correspondiam somente a uma pequena fração das CNVs supostamente existentes no genoma humano (Zhang et al. 2009). Nos anos subsequentes, muitos estudos usando plataformas de análise genômica de alta resolução avançaram o nosso conhecimento sobre CNVs e um mapa compreensivo foi descrito (Redon et al. 2006; Conrad et al. 2010; Park et al. 2010; Wellcome Trust Case Control Consortium et al. 2010; Zarrei et al. 2015).

Redon e colegas (2006) foram os primeiros a investigar CNVs em múltiplas amostras controle e analisar o seu impacto na genética populacional e na dinâmica genômica. O primeiro mapa de CNVs do genoma humano foi construído utilizando-se 270 indivíduos distribuídos em quatro populações de ancestralidade européia, africana ou asiática. Neste estudo, 1.447 regiões de CNV (12% do genoma humano) foram identificadas e estas regiões continham centenas de genes, *loci* de doenças, elementos funcionais e duplicações segmentais.

Quatro anos após o primeiro mapa, Conrad e colegas (2010) desenvolveram uma estratégia para detectar CNVs maiores que 500 kb no genoma humano e estudaram 450 indivíduos com ancestralidade européia, asiática ou africana. Usando a técnica de *tiling microarray*, com 2,1 milhões de sondas de oligonucleotídeos cobrindo o genoma, o grupo foi capaz de detectar 11.700 regiões de CNV, sendo que a média de tamanho das mesmas foi de 2,7 kb. Além disso, foram detectados 30 *loci* com CNVs que são candidatas a influenciar doenças específicas.

Mais recentemente, Zarrei e colaboradores (2015) compilaram dados de alta qualidade de indivíduos da população em geral, provenientes de 55 estudos, e disponíveis em bancos de dados públicos, e geraram um mapa atualizado de CNVs do genoma humano. Enquanto Conrad e colaboradores (2010) postularam que 3,7% do genoma humano era CNV, no trabalho de Zarrei e colegas (2015) foi estimado um valor de 4,8%. Esta diferença entre as porcentagens pode ter ocorrido porque no trabalho de Zarrei e colegas, mais amostras e um *background* étnico mais amplo foram incluídas. Além disso, a compilação de dados incluiu variantes que foram encontradas utilizando-se técnicas de NGS (*next generation sequencing*), que detecta variantes menores do que aquelas capturadas em técnicas baseadas em *arrays*. No total, o mapa compreendeu 3.132 regiões de ganhos e 23.438 regiões de perdas (Zarrei et al. 2015).

Consequências biológicas das CNVs

Uma questão fundamental na pesquisa biomédica atual é estabelecer ligação entre a variação genômica e as diferenças fenotípicas, que abrangem tanto variações polimórficas quanto a patológicas, que podem causar ou predispor a doenças (Henrichsen et al. 2009). Atualmente, as CNVs têm recebido considerável interesse como fonte de diversidade genética por seu papel potencial na variação funcional (lafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004; Redon et al. 2006; Choy et al. 2010; 1000 Genomes Project Consortium et al. 2015). Além disso, um grande número de estudos evidencia a associação de CNVs com doenças complexas e mediação a resposta ambiental (McCarroll e Altshuler 2007; de Smith et al. 2008; Hollox e Hoh 2014).

CNVs podem expressar fenótipos através dos seguintes mecanismos moleculares: (a) dosagem gênica, (b) interrupção gênica, (c) fusão gênica, (d) efeitos de posição, (e) desmascaramento do alelo recessivo ou polimorfismos funcionais e (f) efeitos de transvecção potencial (Zhang et al. 2009).

CNVs envolvendo genes sensíveis à dosagem podem alterar os níveis de expressão e, conseqüentemente, causar fenótipos clínicos. Um exemplo é o gene *PM22*, que codifica a proteína mielóide periférica e está localizado na região cromossômica 17p12. A duplicação desse gene leva à Doença de Charcot-Marie Tooth do tipo 1A (CMT1A), enquanto que a sua deleção pode levar à neuropatia hereditária com susceptibilidade a paralisia por pressão (NHPP) (Inoue et al. 2001; Zhang et al. 2010).

Quando o ponto de quebra de uma deleção, inserção ou duplicação em *tandem* está localizada dentro de um gene, a interrupção pode causar a sua perda de função devido ao rompimento ou dissociação de promotores ou outros elementos regulatórios, ou afetar a estrutura da cromatina (Zhang et al. 2009; Lee e Scherer 2010).

Fusão causada por rearranjos genômicos entre diferentes genes ou por suas sequências regulatórias podem gerar mutações com ganho de função. Este mecanismo ocorre principalmente em cânceres associados com translocações cromossômicas somáticas. Um exemplo é a fusão entre os genes *PRSS1* e *PRSS2*, que causa a pancreatite hereditária através da combinação do efeito de ganho de função duplo (Masson et al. 2008).

CNVs podem, indiretamente, afetar a transcrição de elementos regulatórios, levando a níveis de expressão alterados, através de um efeito posicional (Rodriguez-Revenga et al. 2007; Bhatia e Kleinjan 2014). Por exemplo, a deleção de um repressor pode levar o gene associado a níveis transcricionais elevados, enquanto que duplicações de sequências de DNA, que estão 3' ao promotor, podem levar a um decréscimo dos níveis de expressão gênica devido à posição sub-ótima do promotor em relação ao gene (Rodriguez-Revenga et al. 2007).

Alelos recessivos manifestam o seu fenótipo na ausência de um alelo dominante. Um alelo recessivo em um cromossomo pode expressar o seu fenótipo através da deleção do alelo normal no seu homólogo (Iyer e Girirajan 2015). Haldeman-Englert et al. (2009) descrevem um paciente com múltiplas

anomalias congênitas diagnosticado com síndrome de Peter Plus. Após análise por aCGH, os autores encontraram no paciente uma deleção em heterozigose que incluía o gene *B3GALT1*. Posteriormente o alelo remanescente foi sequenciado e uma mutação previamente descrita em pacientes com essa síndrome foi identificada (Haldeman-Englert et al. 2009).

Transvecção, ou seja, a influência da expressão gênica sobre o pareamento de alelos nos cromossomos homólogos, é um mecanismo de trans-regulação. O seu efeito é mediado via a deleção de um gene (e os seus elementos regulatórios próximos) que é requerido para a comunicação entre alelos (Lupski e Stankiewicz 2005; Zhang et al. 2009).

Adicionalmente, há de se destacar as CNVs que afetam cópias múltiplas dos mesmos genes (aqueles genes com múltiplas cópias e que estão geralmente agrupados na mesma localização genômica). O número de cópias desses genes, frequentemente envolvidos em vias inflamatórias ou imunológicas e exibindo uma grande variação no número de cópias, pode estar associado a fenótipos de espectro contínuo na população normal, tais como diferenças na predisposição a doenças (Silva et al. 2014).

Interpretação das CNVs: relevância clínica

É sabido que CNVs não são somente uma fonte prevalente de variação genética na população geral, mas também uma causa importante de manifestação ou predisposição a muitas doenças do neurodesenvolvimento, incluindo DI, esquizofrenia, epilepsia e autismo (Merikangas et al. 2009; Morrow 2010; Cooper et al. 2011; Kearney et al. 2011; Grayton et al. 2012; Asadollahi et al. 2014; Gilissen et al. 2014).

A detecção precisa das CNVs usando *microarrays* genômicos resultou numa ampla aplicação dessa técnica e, em 2010, se tornou a primeira escolha como ferramenta de diagnóstico da DI idiopática (Miller et al. 2010; Vissers et al. 2010). Todavia, a interpretação de CNVs para o diagnóstico clínico têm sido

um grande desafio, especialmente ao determinar se a variação é ou não patogênica ao analisar pacientes com fenótipos anormais (Lee et al. 2007; Whitby et al. 2008). Por outro lado, com o aumento de casos estudados, a descoberta de novas CNVs patogênicas tem também levado à identificação de novas síndromes genéticas (Koolen et al. 2006; Krepischi-Santos et al. 2006; Kashevarova et al. 2014; Reinstein et al. 2016).

Consequentemente, diferentes critérios (Veja tabela 2) e diretrizes foram propostos para definir a patogenicidade das CNVs (Lee et al. 2007; Buysse et al. 2009; Koolen et al. 2009; Leung et al. 2010; Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011; Hanemaaijer et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013; Howell et al. 2013). Critérios comuns incluem, por exemplo, o tamanho da CNV, presença ou ausência nos genitores, conteúdo gênico e evidência patogênica em bancos de dados públicos (Tabela 2).

A discriminação entre CNVs comuns, provavelmente benignas e que não estão envolvidas no fenótipo clínico, das CNVs raras, potencialmente patogênicas, é o primeiro passo no processo de interpretação (Whitby et al. 2008). Desde a publicação dos primeiros mapas globais de CNV já discutidos anteriormente, é importante reconhecer quais CNVs são comuns (também observadas em indivíduos da população em geral) (Gijsbers et al. 2011). CNVs identificadas em controles têm sido documentadas em bancos de dados disponíveis publicamente, tais como o "*Database of Genomic Variants*" (MacDonald et al. 2014). Até agosto de 2016, o banco de dados continha 552.586 CNVs proveniente de 72 artigos publicados.

Desse modo, CNVs podem ser classificadas como benignas quando CNVs similares foram encontradas em múltiplos (>1%) controles não afetados (Hehir-Kwa et al. 2013). Obviamente, não só a presença ou ausência da CNV deve ser considerada, mas a quantidade de sobreposição com a CNV encontrada em indivíduos não afetados também deve ser levada em consideração (Gijsbers et al. 2011). Muitas das informações do DGV são derivadas de projetos de descobertas de CNVs que usaram uma plataforma única e/ou tecnologia para identificá-las, e somente uma pequena fração das

CNVs identificadas é validada (Koolen et al. 2009). Sendo assim, isto eleva a possibilidade de uma quantidade dos dados ser errônea e, conseqüentemente, um maior cuidado deve ser tomado quando determinar se uma CNV é clinicamente significativa (Lee et al. 2007).

Após ter excluído as CNVs comuns, as CNVs restantes podem ser consideradas candidatas à patogenicidade. Uma vez que a CNV identificada é rara, bancos de dados públicos estão disponíveis e contém informação de CNVs patogênicas. Um desses bancos de dados é o DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) (Firth et al. 2009). Este *databank* coleta informações clínicas sobre o paciente, juntamente com dados relacionados à natureza da alteração cromossômica (microdeleções e microduplicações). Até agosto de 2016, o banco de dados continha informação de 21.511 pacientes. Se casos similares são encontrados no banco de dados, isto aumenta a probabilidade de patogenicidade da CNV.

CNVs que sobrepõem a regiões de síndromes de microdeleções ou microduplicações conhecidas (ou que se sobrepõem a regiões genômicas que são definidas como clinicamente significantes, tais como regiões subteloméricas) são provavelmente patogênicas por natureza (Lee et al. 2007; Gijsbers et al. 2011). Para fins de diagnóstico, essas CNVs devem incluir a região crítica da síndrome e, se conhecido, o gene causativo (Gijsbers et al. 2011).

Fazer o teste nos pais é o caminho para determinar se a CNV é *de novo* – e, se for, é provável que seja patogênica. Usualmente, CNVs herdadas de pais fenotipicamente normais são benignas. Todavia, muitas CNVs têm sido descritas com penetrância incompleta ou expressividade variável; sendo assim, um cuidado maior deve ser tomado ao aconselhar famílias (Srouf e Shevell 2014).

Para as CNVs que são *de novo* (especialmente aquelas que não foram observadas entre os indivíduos da população em geral e não coincidem com CNVs recorrentes observadas em indivíduos com fenótipos clínicos similares),

muitos fatores podem ser usados para guiar a avaliação da sua relevância clínica, tais como tamanho, localização (intersticial, centromérica ou em regiões repetidas), tipo (deleção ou duplicação) e conteúdo gênico (Lee et al. 2007; Koolen et al. 2009; Leung et al. 2010; Hanemaaijer et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013).

Desde que o tamanho da CNV está associado com o número de genes afetados, a probabilidade de patogenicidade aumenta com o tamanho da CNV (Hehir-Kwa et al. 2013). CNVs grandes e contínuas podem abranger mais genes, o que aumenta a probabilidade de alterar algum gene sensível a dosagem (Watson et al. 2014). Todavia, CNVs aparentemente benignas também podem ser encontradas em baixa frequência no tamanho de 2 Mb (Redon et al. 2006), e há raros casos de CNVs benignas com 10 Mb (Hansson et al. 2007).

É sabido que duplicações são alterações genéticas melhor toleradas que deleções e, portanto, que deleções têm uma probabilidade maior de serem patogênicas. Contudo, deleções de uma única cópia também podem ser encontradas em indivíduos da população geral (Lee et al. 2007, Tucker et al. 2013).

A potencial relevância clínica de uma CNV aumenta com relação ao número de genes dentro da região em desequilíbrio. Isto é especialmente verdadeiro se genes de morbidade OMIM estão presentes, se eles são conhecidos como importantes para o desenvolvimento e/ou se eles têm um efeito fenotípico sabido de dosagem (Lee et al. 2007).

Juntamente com as CNVs patogênicas, as plataformas de *microarrays* também tem identificado muitas outras CNVs que são difíceis de serem categorizadas em benignas ou patogênicas. Estas CNVs são chamadas de variantes de significado incerto (VUS) (Manning et al. 2010; Reiff et al. 2012). São alterações que não foram previamente descritas, nem foram vistas (em frequência razoável) em indivíduos controle já estudados (por exemplo, no DGV), além de não haver dados suficientes sobre genes presentes naquela

região (Reiff et al. 2012). Determinar a significância clínica pode ser difícil, o que dificulta a compreensão dos resultados genéticos (Jez et al. 2015). Atualmente, esse tipo de variação representa um grande desafio que os citogeneticistas e geneticistas clínicos enfrentam, impactando o aconselhamento genético, os riscos de recorrência e o diagnóstico pré-natal (Boggula et al. 2015)

CRITÉRIOS	PATOGÊNICA	BENIGNA	VUS
ESTRUTURAL			
CNV idêntica à de um pai afetado	X		
CNV idêntica à CNV de um parente normal		X	
CNV sobreposta às coordenadas genômicas de um desequilíbrio conhecido	X		
CNV completamente contida entre as coordenadas de um desequilíbrio genômico, definido por um banco de dados de pacientes afetados	X		
CNV é duplicação (sem genes sabidamente sensíveis à dosagem)		X	
CNV catalogada em um banco de dados da população geral		X	
FUNCIONAL			
CNV contém genes de morbidade OMIM e é deleção	X		
CNV tem um fenótipo <i>knockout</i> de camundongo	X		
CNV possui genes que exibem haploinsuficiência conhecida	X	X	
MODO DE HERANÇA			
CNV com fenótipo variável	X		X
CNV herdada de uma deleção publicada ou bem reconhecida ou síndrome de duplicação	X		
CNV expandida ou alterada herdada de um dos pais mas não contida em uma região de CNV conhecida		X	X

Tabela 2: Critérios utilizados para a interpretação clínica das CNVs (Leung et al. 2010)

CNVs e a deficiência intelectual

Muitas CNVs têm um apreciável impacto no funcionamento mental humano, mas frequentemente o seu grande tamanho impede a especificação de quais dos genes presentes na CNV estão envolvidos no fenótipo. A patogenicidade de muitas das CNVs observadas no ambiente clínico é desconhecida porque são extremamente raras e, portanto, grandes estudos de investigação caso-controle são necessários para aumentar a significância dos achados (Cooper et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Coe et al. 2014). Por isso, a associação de CNVs e deficiência intelectual tem sido documentada em muitos artigos que utilizam desde pequenos grupos até grandes coortes de pacientes (Sagoo et al. 2009; Cooper et al. 2011; Coe et al. 2014; Qiao et al. 2014).

Análises em larga escala de dados de *microarrays* de pacientes com DI e ADNPM são agora possíveis e têm sido usadas para catalogar regiões do genoma humano sensíveis a dosagem (Kaminsky et al. 2011).

Em 2011, Cooper e colaboradores publicaram um dos maiores mapas de morbilidade investigando o papel de CNVs raras em pacientes que apresentam DI e ADNPM, associado a uma série de fenótipos (má formações congénitas, hipotonia, atraso no crescimento, entre outros). Eles analisaram 15.767 pacientes com DI e 8.329 controles. Os dados mostram a massiva contribuição de grandes CNVs para as doenças pediátricas, sendo que 25,7% dos pacientes apresentavam CNVs maiores que 400 kb; de acordo com os autores, 14% das doenças que os pacientes apresentavam eram causadas por CNVs maiores que 400 kb.

Embora várias CNVs patogênicas de tamanho grande sejam conhecidas, a maioria das CNVs raras são de tamanho intermediário. Männik e colaboradores (2015) encontraram associação positiva de CNVs de tamanho intermediário (250 a 500 kb) com pacientes que apresentam DI.

Combinar estudos de CNV e triagem de mutações em pacientes que apresentam uma grande variação de fenótipos relacionados ao

neurodesenvolvimento tem um potencial impacto de descobrir novas síndromes e CNVs patogênicas (Coe et al. 2014).

JUSTIFICATIVA

Embora o consórcio internacional ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium*, 2012) recomende que *arrays* genômicos representem a primeira linha de investigação citogenética nos casos de deficiência intelectual e anomalias congênitas idiopáticas, na maior parte do mundo desenvolvido a maioria dos pacientes sem diagnóstico já havia sido previamente cariotipado quando submetido ao teste de *array*. Sendo assim, o presente projeto tem o intuito de identificar anomalias cromossômicas em uma amostra de pacientes com DI moderado e grave, apresentando ou não aspectos dismórficos e anomalias congênitas, de causa idiopática, grande parte dos quais (28 pacientes) não foram previamente cariotipados.

Adicionalmente, o uso de genotipagem na caracterização de alterações estruturais e composição celular de alterações em mosaico é uma abordagem pouco explorada. Sendo assim, pretende-se também caracterizar por SNP-*array* e FISH alterações cromossômicas identificadas, sobretudo as complexas.

II. OBJETIVOS

✓ OBJETIVOS GERAIS

1. Identificar, através de *SNP array*, o espectro de anomalias cromossômicas em uma coorte de pacientes com DI moderado e grave idiopática, apresentando ou não aspectos dismórficos e anomalias congênitas.
2. Verificar o potencial de padrões de desequilíbrio alélico observado em resultados de *SNP array* para a identificação e compreensão dos mecanismos de alteração cromossômica.

✓ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar teste de *SNP array* de alta resolução em uma coorte de 40 pacientes com DI idiopática.
2. Verificar o tipo e frequência das alterações encontradas na amostra.
3. Caracterizar as alterações cromossômicas complementando, quando necessário, com estudos de FISH em preparações metafásicas.
4. Quando necessário e possível, verificar a herança das alterações por *SNP array* ou FISH.
5. Realizar o aconselhamento genético das famílias.

Pacientes e métodos

III. Pacientes e métodos

III.1 Pacientes

Para o presente trabalho, foram selecionados 40 pacientes atendidos consecutivamente, provenientes de três Centros: 28 pacientes do Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência (CAOE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP); 6 pacientes do Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP); e 6 pacientes do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Estes pacientes são um subgrupo de um projeto maior, com um número amostral de 300 indivíduos. Todos apresentavam deficiência intelectual moderada a grave e muitos deles exibiam aspectos dismórficos ou anomalias congênitas associados.

Pacientes que já apresentavam um diagnóstico prévio ou uma causa ambiental clara foram excluídos do estudo. Todos os pacientes apresentavam cariótipo com resultado normal, com exceção daqueles provenientes do CAOÉ, que não tinham cariótipo realizado.

Os pais ou responsáveis legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I) e foram submetidos a uma anamnese (Anexo II).

O presente estudo faz parte do projeto que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob o número do protocolo 075/2007.

III.2 Métodos

III.2.1 Coleta de saliva e/ou sangue para extração de DNA genômico

Para os pacientes do Serviço de Aconselhamento Genético do IBUSP e do Hospital da Criança da FMUSP, as amostras de DNA haviam sido

previamente extraídas de sangue periférico, segundo rotina de cada laboratório, e encaminhadas para o presente estudo.

Para os pacientes do CAOÉ, o DNA foi extraído de saliva e, em alguns casos, também de sangue periférico. A saliva foi coletada utilizando-se o *kit Oragene™ DNA* (Genotek, Ottawa, Canada) e estocada a 4°C, seguindo instruções do fabricante. Adicionalmente, para a coleta de sangue periférico, foram utilizados tubos Vacutainer® contendo EDTA. O DNA foi extraído utilizando-se o método de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, USA).

III.2.2 SNP array e interpretação dos resultados

Os experimentos para genotipagem e avaliação de alterações em número de cópias a partir das intensidades de hibridação foram feitas utilizando-se o CytoSNP-850K BeadChip (Illumina, USA). Este SNP array contém, aproximadamente, 850.000 SNP's abrangendo todo o genoma e com uma cobertura enriquecida de 3.262 genes sensíveis à dosagem, de relevância citogenética conhecida, tanto em aplicações de doenças constitucionais quanto em câncer. A lista de genes definida foi baseada na Colaboração Internacional para Genômica Clínica (ICCHG) (<https://www.clinicalgenome.org/>).

A marcação, hibridação e lavagem foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, na companhia de biotecnologia Deoxi. Posteriormente, as lâminas foram escaneadas usando o iScan System (Illumina, USA), e os arquivos .gtc gerados foram analisados no BlueFuse Multi Software v3.2 (BlueGenome, UK) para avaliar a qualidade do experimento e chamar (*call*) alterações em número de cópias e blocos de homozigose, ou outros desbalanceamentos alélicos.

Os critérios de análise usados incluíam: (a) reportar apenas CNVs não sabidamente polimórficas na população (CNVs raras) ou que não contenham genes; (b) reportar apenas CNVs maiores que 300 Kb ou associadas a genes com significado clínico conhecido (*Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM: <http://www.omim.org>); (c) reportar a presença de um ou mais segmentos cromossômicos em homozigose maior que 10 Mb, ou dois ou mais segmentos cromossômicos maiores que 5 Mb em homozigose. As variantes encontradas segundo os critérios estabelecidos foram comparadas às variantes do *Database of Genomic Variants* (DGV: <http://projects.tcag.ca/variation/>), que compila as publicações que documentam CNV's em populações normais e do *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans* (DECIPHER: <https://decipher.sanger.ac.uk/>), que compila dados de alterações encontradas em indivíduos com fenótipos alterados. Para a investigação dos genes localizados em tais regiões foram realizadas análises *in silico* nos bancos de dados do USCC Genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) e publicações referentes aos genes ou alterações encontradas.

CNV's foram classificadas como "patogênica", "benigna" ou de "significado desconhecido" (*Variant of unknown significance* - VUS). Especificamente, uma CNV foi considerada "patogênica" se: (a) nos bancos de dados analisados, houver uma associação bem estabelecida na literatura com uma síndrome ou doença específica, ou; (b) que contenha um gene sensível à dosagem reconhecido, ou; (c) se for uma CNV grande (> 5 Mb) e rara ou contendo genes considerados potencialmente relevantes com base na literatura *peer-reviewed*. A CNV foi designada "de susceptibilidade" se ela for mapeada em um *locus* de microduplicação ou microdeleção recorrente com uma associação bem estabelecida com um fenótipo anormal, mas onde a penetrância é incompleta ou expressão fenotípica é muito variável. A CNV foi considerada como sendo de "significado desconhecido" se ela fosse rara, >300kb e não apresentasse evidências de patogenicidade (Lee et al. 2007; Buysse et al. 2009; Koolen et al. 2009; Leung et al. 2010; Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011; Hanemaaijer et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013; Howell et al. 2013).

III.2.3 Análise citogenética e FISH

a) Cultura de linfócitos (modificada de Moorhead et al. 1960)

Para o estudo cromossômico, coletou-se sangue periférico de alguns pacientes e/ou seus progenitores, utilizando-se tubos contendo heparina. Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI contendo 20% de soro fetal bovino, antibióticos (gentamicina e estreptomicina a 1%) e 2% de fitohemaglutinina (PHA), na estufa a 37°C. Após 72 horas, para bloquear as células em metáfase, foi adicionada colchicina (0,0016%) ao meio de cultura por 45 minutos. Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado, desprezado o sobrenadante e adicionado solução hipotônica contendo cloreto de potássio (0,075M). Posteriormente, as células foram fixadas em metanol:ácido acético 3:1. Parte do material foi conservada a -20°C e uma outra parte foi utilizada para preparação das lâminas.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a suspensão de células foi pingada em lâminas molhadas e, posteriormente, levadas à estufa a 37°C por 24 horas.

b) Hibridação *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH)

As sondas utilizadas nos experimentos de FISH são segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais bacterianos (BAC's) ou cromossomos artificiais derivados do fago P1 (PAC) e fazem parte de uma biblioteca de sondas espaçadas ~1 Mb no genoma, gentilmente doada pelo Dr. Nigel Carter (Sanger Center, Wellcome Trust, UK). Informações sobre as sondas podem ser obtidas no *Ensembl Genome Browse* (<http://www.ensembl.org/archive>), sob a denominação *1Mb clone set*.

As sondas escolhidas foram cultivadas *overnight* em meio LB (1% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH=7,5) contendo antibiótico

para o seu respectivo gene de resistência. Posteriormente, o DNA foi extraído utilizando-se o *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (GE, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As sondas marcadas com biotina ou digoxigenina foram geradas por *nick translation*, utilizando-se o *kit* de marcação *Biotin Nick Translation Mix* ou *DIG Nick Translation Mix* (Roche, Alemanha), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As etapas de desnaturação, hibridação, lavagem e pós hibridação e imunodeteção seguiram os protocolos já descritos (Rosenberg et al. 1998).

Para os experimentos de FISH usando sondas teloméricas (*all telomeres*), utilizou-se o *kit* Telomere PNA FISH Kit/FITC (Peptide nucleic acid) (Dako, UK) de acordo com as instruções do fabricante.

As lâminas foram montadas em meio Vectashield® contendo DAPI (0.1 µg/mL) (SIGMA, USA). Os sinais fluorescentes foram visualizados no microscópio Zeiss Axiophote (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando-se uma câmera CCD com o software ISIS (MetaSystems, Alemanha).

III.3 Financiamento

O presente estudo fez parte do projeto PIPE intitulado "*Arrays genômicos de alta resolução e next generation sequencing no diagnóstico de deficiência intelectual*" (FAPESP n.º 2012/50981-5). Os outros experimentos foram financiados pelo projeto temático da orientadora (FAPESP 2009/00898-1) e pelo CEPID Genoma Humano (FAPESP n.º 13/08028-1).

Resultados

IV. RESULTADOS

No presente estudo, 40 Pacientes com DI idiopática foram genotipados por SNP *array* para investigar alterações em número de cópias de segmentos de DNA. Foram identificadas 21 alterações no número de cópias (CNVs raras) em 19 pacientes (Tabela 3). Quatorze dessas alterações foram microdeleções e 7 foram microduplicações. Adicionalmente, um paciente apresentou nove regiões de homozigose distribuídas em oito cromossomos distintos (Tabela 4). O tamanho das alterações encontradas variou de 0,13 a 144,58 Mb. Foram encontradas alterações consideradas patogênicas em 12 dos pacientes (taxa de diagnóstico de 30%). Além disso, seis pacientes apresentaram variantes de significado incerto (VUS – *variants of unknown significance*).

Paciente 1

Paciente do sexo masculino, 1 ano de idade, filho único de um casamento não consanguíneo. Mãe relata não ter havido nenhuma intercorrência durante o período gestacional. Nasceu a termo, de parto cesáreo, apresentando baixo peso.

Apresenta braquicefalia, hipertelorismo, epicanto interno bilateral, hipoplasia do osso nasal, narinas antevertidas, pavilhão auricular proeminente e com implantação baixa, clindactilia do quinto dedo. Apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, senta com apoio e não fala. Paciente tem epilepsia e é tratado com barbitúricos.

O resultado do SNP *array* mostrou uma duplicação intersticial de 0,89 Mb na região 1q21.1q21.2 (Figura 4). A alteração não abrange nenhum gene OMIM.

Figura 4: Resultados do SNP *array* para o paciente 1. A) Perfil do número de cópias mostrando a região de duplicação intersticial de 0,89 Mb de 1q21.1q21.2. B) Padrão de SNPs mostrando aumento de combinações alélicas presentes.

Paciente 2

Paciente do sexo masculino, tem 26 anos, segundo filho de um casamento não consanguíneo. A mãe relatou, em entrevista, que a gestação não apresentou intercorrências. A bolsa amniótica rompeu antes dos nove meses, o que levou a um parto prematuro. Aos dois meses de idade, começou a ter convulsões recorrentes e, como consequência, não conseguia sugar o leite quando se alimentava. Para tratar as convulsões, faz uso da medicação Epilenil.

Possui distúrbios de linguagem (não consegue se expressar e a pronúncia é de difícil compreensão) e apresenta comportamento irritável e agitado. Com base no desempenho, tem deficiência intelectual grave e um primo com um grau mais grave de DI foi referido.

O Paciente apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM): somente após 1 ano, a criança sentou com apoio e sustentou o pescoço. Possui olhos fundos, orelhas assimétricas, hipoplasia da face média, queixo pontudo, filtro nasolabial longo, nariz plano.

O SNP *array* mostrou que o Paciente apresenta uma deleção terminal de 4,03 Mb na região 1p36.33p36.32 (Figura 5). Além disso, na região de 114,5 Mb não deletada do braço curto do cromossomo um, apresenta desbalanceamento de frequência alélica em gradiente decrescente em direção a 0.5 de pter para o centrômero (na região 1p36.32p12). O banco de dados do DECIPHER mostrou que a deleção encontrada se sobrepõe à síndrome de microdeleção 1p36 (OMIM #607872).

Figura 5: Resultados do SNP *array* para o Paciente 2. A) Perfil do número de cópias do cromossomo 1 mostrando a deleção terminal de 4,03 Mb de 1p36.33p36.32. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada (em amarelo) e um gradiente da região do ponto de quebra em 1p36 convergindo para 0,5 na direção da região pericentromérica 1p12.

Paciente 3

O paciente é do sexo masculino, 12 anos de idade, apresenta um irmão com DI. Mãe relata não ter havido intercorrências durante a gestação. Nasceu a termo, de parto normal e em boas condições de vitalidade. Apresentou desenvolvimento normal. Frequenta a escola desde os três anos de idade, porém, não sabe ler nem escrever. Não apresenta dismorfismos faciais.

Foi encontrada uma deleção intersticial de 2,28 Mb na região 4q35.2 (Figura 6). A alteração foi classificada como VUS.

Figura 6: Resultados de SNP array do Paciente 3. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 2,28 Mb de 4q35.2. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada.

Paciente 4

Paciente do sexo masculino, 24 anos, terceiro filho de um casamento não consanguíneo.

A mãe do Paciente relatou que não houve intercorrências nos períodos gestacional e perinatal. Apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, tendo andado e falado somente aos 3 anos. Atualmente, o Paciente apenas repete palavras ditas a ele e não forma frases. Apresenta, aproximadamente, duas convulsões por mês. É extremamente agitado e possui o hábito de morder-se. Faz uso da medicação carbamazepina. Adicionalmente, apresenta olhos fundos e filtro nasolabial longo.

A análise do SNP array encontrou uma alteração de 0,83 Mb no cromossomo 6, na região 6q12q13 (Figura 7). Após análise nos bancos de dados, a deleção foi classificada como VUS.

Figura 7: Resultados do SNP array para o Paciente 4. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção de 0,83 Mb em 6q12q13. B) Padrão de SNPs mostrando, como esperado, homozigose na região deletada.

Paciente 5

Paciente do sexo masculino, 1 ano de idade, filho único de um casamento não consanguíneo. Mãe relata que não houve intercorrências durante a gravidez. O paciente nasceu prematuro, de parto cesáreo. Durante o período perinatal, o Paciente apresentou hipertensão pulmonar e insuficiência renal aguda, permanecendo internado durante 35 dias.

Exames clínicos revelaram malformações cardíacas. Apresenta atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e realiza terapias de apoio. Apresenta fontanela fechada, face com aparente hipotelorismo, com certa assimetria ocular e dente incisivo único.

O resultado de SNP array detectou uma deleção intersticial de 4,23 Mb de 7q36.2q36.3 (Figura 8).

Figura 8: Resultados do SNP *array* para o Paciente 5. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 4,23 Mb de 7q36.2q36.3. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada.

Paciente 6

Paciente do sexo feminino, 5 anos, e filha única de um casamento não consanguíneo. Durante a gravidez, a mãe apresentou hipertensão. Em relação ao desenvolvimento neuropsicomotor, a Paciente ainda não anda e não fala. Apresenta um quadro de DI grave. O exame clínico mostrou que a Paciente apresenta palato alto. Faz uso das medicações fenobarbital e topiramato.

A análise do SNP *array* mostrou uma deleção intersticial de 0,13 Mb da região 9p24.1 (Figura 9) e, após análise nos bancos de dados, a mesma foi classificada como VUS.

Figura 9: Resultados do SNP array para a Paciente 6. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 0,13 Mb de 9p24.1. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada.

Paciente 7

Paciente é do sexo masculino, 11 anos, filho único de um casamento não consanguíneo. Possui histórico de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, porém, o pai não soube precisar quando o Paciente andou, sentou e falou. Tem dificuldade de aprendizagem, contudo, sabe ler e escrever.

Foi encontrada uma deleção intersticial de 0,64 Mb em 10q21.1 (Figura 10). Classificou-se a alteração como VUS.

Figura 10: Resultados do SNP *array* para o Paciente 7. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 0,64 Mb de 10q21.1. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada.

Paciente 8

Paciente do sexo masculino, 2 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. Mãe refere ter apresentado hipotireoidismo durante o período gestacional e, conseqüentemente, fez reposição hormonal. Paciente nasceu a termo, de parto cesáreo. Logo que nasceu, precisou ser intubado.

Apresenta atraso do DNPM e surdez bilateral profunda. O Paciente sentou sem apoio com 10 meses; fica de pé com apoio, porém, não engatinha.

O Paciente possui dismorfismos faciais (face com bossa frontal, sobrancelhas largas, hemangioma em glabella, olhos com inclinação para cima das fendas palpebrais, nariz pequeno, fenda palatina posterior, retrognatía, orelhas com baixa implantação, com anti-hélices proeminentes e fusão da hélice e anti-hélices), criptorquidia, polegares adutos. O SNP *array* detectou uma deleção terminal 13,05 Mb na região 11q41.1q25 (Figura 11).

Figura 11: Resultados do SNP *array* do Paciente 8. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção terminal de 13,05 Mb de 11q24.1q25. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada

Paciente 9

Paciente 2, do sexo feminino, 13 anos de idade, possui um irmão normal e é filho de pais não consanguíneos. A mãe relatou que não houve intercorrências durante a gravidez. Nascida a termo, também não houve intercorrências no período perinatal. Em relação ao desenvolvimento neuropsicomotor, a Paciente não fala e há três anos apresenta episódios de convulsão. Apresenta dificuldade de atenção. Faz uso das medicações Depakote e Aristab.

O SNP *array* desta Paciente detectou um aumento no número de cópias de segmento intersticial de 6 Mb em 15q11.2q13.1 (Figura 12A). Adicionalmente, o padrão da frequência do alelo B (Figura 12B) indica presença de quatro cópias do segmento (duas adicionais), sugestivo da existência de um cromossomo extranumerário, derivado do segmento do 15q. Segundo o banco de dados DECIPHER, a alteração encontrada se sobrepõe à região da síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636).

Posteriormente, a análise de FISH confirmou que a região cromossômica em número aumentado de cópias, detectada através do SNP

array, estava localizada no marcador cromossômico extranumerário: psu dic(15;15) (marcador pseudodicêntrico do cromossomo 15) (Figura 12C).

Figura 12: Resultados do SNP array (A e B) e FISH (C) para a Paciente 9. A) Perfil de número de cópias e parte do cromossomo 15 indicando cópias adicionais do segmento de 6 Mb de 15q11.2q13.1 B) Padrão de SNPs mostrando um padrão correspondente a quatro cópias na região alterada. C) Experimento de FISH em células metafásicas utilizando-se as sondas específicas para as regiões 15q12 (RP11-142M24 - sinal verde) e centromérica do cromossomo 15 (sinal vermelho). A análise evidenciou a presença de quatro sinais verdes e quatro vermelhos, dois no par de cromossomos 15 normais (setas brancas) e dois referentes ao cromossomo psu dic(15;15) - marcador pseudodicêntrico do 15 (seta amarela).

Paciente 10

Paciente do sexo feminino, 12 anos de idade, segunda filha de pais não consanguíneos. A mãe refere um sobrinho com quadro de convulsão e DI. Durante o período gestacional, a mãe apresentou hipertensão arterial. Nascida a termo, de parto cesáreo e pesando 4kg, a Paciente permaneceu na incubadora durante uma noite, pois apresentava hipotermia. Com relação ao desenvolvimento neuropsicomotor, a Paciente apresenta distúrbios de marcha e fala. É hiperativa e apresenta problemas de atenção. Faz uso da medicação risperidona.

O SNP *array* detectou um aumento de número de cópias de segmento de 7,9 Mb em 15q11.2q13.3 (Figura 13A). Adicionalmente, o padrão de SNPs encontrado indicou a presença de três-quatro cópias da região alterada (Figura 13B). Segundo o banco de dados DECIPHER, a alteração encontrada se sobrepõe à região da síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636).

O experimento de FISH demonstrou que as duplicações mapeavam na mesma região de origem, supostamente em *tandem* (Figura 13C).

Figura 13: Resultados do SNP array (A e B) e FISH (C) para a Paciente 10. A) Perfil do número de cópias da região duplicada-triplicada de segmento de 7,9 Mb de 15q11.2q13.3. B) Padrão de SNPs mostrando um padrão correspondente a três-quatro cópias na região alterada. C) Experimento de FISH em célula metafásica utilizando-se a sonda específica para a região 15q12 (RP11-142M24 - sinal vermelho), mostrando que um dos cromossomos possui uma intensidade de sinal muito maior do que o seu homólogo.

Paciente 11

Paciente do sexo feminino, 10 anos, segunda filha de pais não consanguíneos. Durante a gestação, mãe relata não ter havido intercorrências. Com relação ao desenvolvimento neuropsicomotor, andou quando tinha 1 ano e 8 meses e apresenta distúrbios de fala. Tem problemas de sociabilização, fala e déficit de atenção. Apresenta hipertelorismo e baixa implantação das orelhas. Faz uso da medicação Ritalina e risperidona.

O teste de SNP *array* revelou um aumento do número de cópias de um segmento de 9,76 Mb da região 15q11.2q13.3 (Figura 14). Segundo banco de dados, o aumento do número de cópias nessa região está associado à síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636). O padrão de SNPs indica a presença de quatro cópias da maior parte da região e três cópias do segmento mais distal.

Posteriormente, a análise de FISH também confirmou que a região cromossômica em número aumentado de cópias, detectada através do SNP *array*, estava localizada no marcador cromossômico extranumerário: psu dic(15;15) (marcador pseudodicêntrico do cromossomo 15) (Figura 14C).

Figura 14: Resultados do SNP *array* (A e B) e FISH (C) para a Paciente 11. A) Perfil do número de cópias da região contendo o segmento duplicado-triplicado de 9,76 Mb de 15q11.2q13.3. B) Padrão de SNPs mostrando um padrão correspondente a três-quatro cópias na região alterada. C) Experimento de FISH em células metafásicas utilizando-se as sondas específicas para as regiões 15q12(RP11 142M24 - sinal verde) e centromérica do cromossomo 15 (sinal vermelho). A análise evidenciou a presença de quatro sinais verdes e quatro vermelhos, dois no par de cromossomos 15 normais (setas brancas) e dois referentes ao cromossomo psu dic(15,15) - marcador pseudodicêntrico do cromossomo 15 (seta amarela).

Paciente 12

Paciente do sexo masculino, 19 anos, possui três irmãos normais. A mãe relatou que não houve intercorrências durante a gravidez. Além disso, não há relatos de casamento consanguíneo na família. Referem uma prima com síndrome de Down e um primo com DI, ambos por parte de pai. Segundo a mãe, o tio dela também possui deficiência intelectual, porém, com quadro de convulsão.

Apesar de ter dificuldade de aprendizado, chega a ler e escrever um pouco. Além disso, apresenta problemas de atenção e é agressivo. O paciente não apresenta dismorfismos faciais.

O SNP *array* detectou duas alterações cromossômicas: uma duplicação terminal de 20,4 Mb na região 16q22.1q24.3 (Figuras 15A e B) e uma deleção terminal de 1,76 Mb na região 1q44 (Figura 15C e D).

O experimento de FISH utilizando-se sondas da região 16q22.1 e subtelomérica do 1q não confirmou a alteração no número de cópias detectada por SNP *array* em material de saliva (Figura 15E).

E

Figura 15: Resultados dos SNP arrays (A-D) e FISH (E) para o Paciente 12. A-B) SNP array mostrando a duplicação terminal de 20,4 Mb na região 16q22.1q24.3. C-D) SNP array mostrando a deleção terminal de 1,76 Mb na região 1q44. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da duplicação de 20,4 Mb de 16q22. B) Padrão de SNPs mostrando aumento de combinações alélicas, como esperado para duplicações. C) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção terminal de 1,76 Mb de 1q44. D) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada. E) Experimento de FISH em célula metafásica com as sondas subteloméricas marcando as regiões 16q (RP11-556H2 - sinal vermelho) e 1q (CTB 160H23 - sinal verde). A análise demonstra que há dois sinais verdes e dois sinais vermelhos correspondentes a dois cromossomos 1 e dois cromossomos 16 sem alteração do número de cópias.

Paciente 13

Paciente do sexo masculino, 13 anos de idade, apresenta três irmãos normais e uma irmã com quadro de DI. A mãe relatou não ter havido intercorrências durante a gravidez.

Com relação ao desenvolvimento neuropsicomotor, andou aos 2 anos e falou aos 3 anos de idade. Não lê e é bem agitado. Apresenta palato alto e estreito.

O SNP array mostrou uma deleção intersticial de 0,54 Mb na região 16p11.2 (Figura 16). O DECIPHER mostra que a região alterada se sobrepõe à síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM #611913).

Figura 16: Resultados do SNP array para o Paciente 13. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção de 0,54 Mb na região 16p11.2. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada

Paciente 14

Paciente do sexo feminino, tem 3 anos de idade e é filha de um casamento não consanguíneo. Mãe relata não ter havido problemas durante a gestação. Nasceu a termo, de parto cesáreo.

Foi diagnosticada com cardiopatia congênita. Apresenta déficit pondero-estatural, nariz tubular, palato alto, dedos afilados e estrabismo.

A análise de SNP array detectou uma deleção intersticial de 0,51 Mb na região 17q21.31 (Figura 17). A deleção encontrada contém a região crítica da microdeleção 17q21.31 (ou síndrome de Koolen-De Vries) (OMIM #610443)

Figura 17: Resultados do SNP array para a Paciente 14. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 0,51 Mb de 17q21.31. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada

Paciente 15

Paciente do sexo feminino, tem quatro anos de idade. A mãe relatou, em entrevista, que a gestação apresentou algumas intercorrências. Durante o período gestacional, a mãe apresentou hipertensão arterial e fez o uso de medicação antiabortiva. Aos cinco meses de gestação, o médico verificou através de ultrassonografia que o cordão estava enrolado no pescoço da criança. Por causa disso, a gestação foi acompanhada semanalmente. A bolsa amniótica rompeu durante a 37ª semana, o que levou a um parto cesáreo. Durante o parto, a mãe apresentou pressão arterial elevada e convulsão. A recém-nascida precisou de banho de luz.

A criança apresentou atraso acentuado no desenvolvimento neuropsicomotor: e a criança sentou com apoio e sustentou o pescoço somente após um ano. Adicionalmente, teve um atraso no desenvolvimento da fala. Faz uso de medicação risperidona.

O diagnóstico clínico revelou perda de audição, ponte nasal ampla, e hipoplasia da face média.

O SNP *array* detectou uma deleção intersticial de 3,91 Mb em 17p11.2 (Figura 18). Segundo o banco de dados, essa alteração contém o segmento genômico clássico da síndrome de Smith–Magenis (OMIM #182290).

Figura 18: Resultados do SNP *array* para a Paciente 15. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da deleção intersticial de 3,91 Mb de 17p11.2. B) Padrão de SNPs mostrando a ausência de heterozigose na região deletada.

Paciente 16

Paciente do sexo masculino, 11 anos de idade, apresenta uma irmã normal e é filho de pais não consanguíneos. A mãe relatou problemas na gravidez que levaram a um parto prematuro aos 6 meses e meio de gestação. O Paciente, após o nascimento, ficou na incubadora por 45 dias. Possui problemas de aprendizagem e de fala.

O SNP *array* do Paciente revelou duas deleções terminais no cromossomo 18. A primeira delas em 18q23, apresentando 1,57 Mb, e a segunda em 18p11.32p11.21, com 15,24 Mb (Figura 19A e B). O experimento de FISH usando as sondas confirmou as duas deleções terminais e, conforme esperado na ausência de ambas regiões teloméricas, mostrou a presença de

um anel cromossômico (Figura 19C e D). A deleção de 15,2Mb do 18p11.32p11.21 resulta na síndrome de deleção cromossômica 18p (OMIM #146390).

Figura 19: Resultados do SNP array (A-B) e FISH (C-E) para o Paciente 16. A) Perfil do número de cópias mostrando as regiões das duas deleções terminais (uma na região cromossômica 18q23 de 1,58 Mb e a outra na região cromossômica 18p11.32p11.21 de 15,24 Mb). B) Padrão de SNPs mostrando os genótipos presentes. C) FISH das sondas teloméricas (RP11 411 - sinal verde- e RP11 563B11 - sinal vermelho) em metáfase do paciente Paciente mostrando o homólogo normal com 2 sinais e a ausência de sinais nos cromossomo em anel (seta). D) FISH utilizando-se como sonda uma biblioteca do 18 (sinal vermelho) e mostrando que o cromossomo em anel é derivado de material do cromossomo 18 (setas). E) Coloração DAPI para a imagem "D" (seta amarela indica o cromossomo 18 em anel)

Paciente 17

Paciente do sexo masculino, 13 anos, filho único de um casamento consanguíneo (os pais são primos em primeiro grau). Mãe refere não ter havido intercorrência durante o período gestacional.

Exames clínicos mostraram que o paciente apresenta assimetria facial, hipoplasia do nervo óptico à esquerda, hidrocefalia, dolicocefalia, dente incisivo único e coloboma de coróide inferior à esquerda.

Foi encontrada uma duplicação intersticial de 1,05 Mb na região do 20q11.21 (Figura 20A e B). Esta alteração foi considerada, após análise nos bancos de dados, como VUS. Adicionalmente, conforme esperado para prole de casal consanguíneo, foram encontradas várias regiões grandes de homozigose (maiores que 10 Mb) nos cromossomos 1, 2, 4, 8, 15, 16, 17 e 20 (Tabela 4 e Figura 20C).

Figura 20: Resultados do SNP array para o Paciente 17. A) Perfil do número de cópias mostrando a região da duplicação intersticial de 1,05 Mb de 20q11.21. B) Padrão de SNPs, mostrando aumento no número de combinações alélicas presentes. C) Resultado da análise de SNPs mostrando os cromossomos com as regiões de homozigose (ROH) (blocos azuis).

Paciente 18

Paciente do sexo masculino, possui 4 anos de idade e é o terceiro filho de pais não consanguíneos. Segundo a mãe, o tio-avô do Paciente apresenta DI.

Durante a gestação, a mãe relatou que houve algumas intercorrências, o que levou o Paciente a nascer de forma prematura (34 semanas), apresentando 1,3 kg; tinha dificuldade de sucção. Com quatro meses teve apneia, com paradas respiratórias, secundária a infecção por clamídia, que o levou a 12 dias em coma.

Andou apenas aos dois anos de idade, começou a falar com três anos e ainda apresenta distúrbios na fala. É hiperativo, possui déficit de atenção e ataques epiléticos. Faz uso das medicações Depakene, fenobarbital, risperidona e Neuleptil.

O SNP *array* encontrou uma deleção intersticial de 2,58 Mb em 22q11.21 (Figura 21A e B). De acordo com o DECIPHER, essa deleção se sobrepõe à síndrome de microdeleção 22q11.2 (ou síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial) (OMIM #188400), que apresentam sinais clínicos superpostos e altamente variáveis e podem incluir, entre outros, atraso de desenvolvimento e fala, convulsões e distúrbios comportamentais.

Devido à extrema variabilidade fenotípica dessa síndrome, em raros casos a deleção é herdada de um genitor não (evidentemente) afetado. Para detectar se um dos pais era portador da deleção, o experimento de FISH foi feito utilizando-se amostras de ambos os pais do Paciente; o resultado mostrou que os pais não são portadores da deleção (Figura 21C e D).

Figura 21: Resultado do teste de SNP *array* do Paciente 18 (A-B). Perfil de número de cópias (A) e padrão de SNPs com região em homozigose (B) de parte do braço longo do cromossomo 22, evidenciando a deleção de 2,58 Mb em 22q11.21. C-D) FISH para a região crítica da síndrome de deleção 22q11.2, utilizando-se a sonda 20260D XX91C (sinal vermelho) (setas), evidenciando dois sinais vermelhos, mostrando ausência de deleção, tanto para a metáfase e intérfase do pai (C) quanto à da mãe (D).

Tabela 3: Variações no número de cópias (CNVs) raras encontradas nos pacientes do presente estudo.

VUS - variante de significado incerto.

Centros de Origem: CAOÉ (Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), IG (Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e SAG (Serviço de Aconselhamento Genético do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo)

* Genes OMIM importantes em doenças do neurodesenvolvimento, tais como deficiência intelectual, autismo, epilepsia e esquizofrenia.

Paciente	Sexo	Centro de Origem	Tipo de alteração	Classificação da CNV	Cromossomo	Banda cromossômica	Resultado (GRCh37/hg19)	Tamanho (Mb)	Número total de genes	Gene(s) de morbidade importante(s)*	Síndrome de microdeleção/microduplicação conhecida
1	H	SAG	Duplicação	VUS	1	1q21.1q21.2	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(146,501,348-147,398,560)x3	0,89	16	-	-
2	H	CAOE	Deleção	Patogênica	1	1p36.33p36.32	arr[GRCh37] 1p36.33p36.32(82,154-4,108,282)x1	4,03	104	<i>TMEM240, GABRD, PEX10</i>	Síndrome de microdeleção 1p36 (ou síndrome da monossomia de 1p36) (OMIM #607872)
			Duplicação	Patogênica	1	1p36.32p12	arr[GRCh37] 1p36.32p12(4,549,307-119,007,709)x3	144,58	1503		-
3	H	SAG	Deleção	VUS	4	4q35.2	arr[GRCh37] 4q35.2(188,434,677-190,710,253)x1	2,28	10	-	-
4	H	CAOE	Deleção	VUS	6	6q12q13	arr[GRCh37] 6q12q13(69,189,605-70,023,164)x1	0,83	1	-	-
5	H	IC	Deleção	Patogênica	7	7q36.2q36.3	arr[GRCh37] 7q36.2q36.3(154,216,037-158,448,959)x1	4,23	32	<i>DPP6, SHH, MNX1</i>	-
6	M	CAOE	Deleção	VUS	9	9p24.1	arr[GRCh37] 9p24.1(6,563,623-6,695,472)x1	0,13	3	-	-

7	H	SAG	Deleção	VUS	10	10q21.1	arr[GRCh37] 10q21.1(54,561,593- 55,201,785)x1	0,64	-	-	-
8	H	IC	Deleção	Patogênica	11	11q41.1q25	arr[GRCh37] 11q24.1q25(121,879,938- 134,934,063)x1	13,05	177	<i>PUS3, CDON, KIRREL3, KCNJI</i>	-
9	M	CAOE	Duplicação	Patogênica	15	15q11q13	arr[GRCh37] 15q11.2q13.1(22,576,118- 28,544,359)x3	6,00	124	<i>NIPAI, NDN, SNRPN, UBE3A, GABRB3 MAGEL2,</i>	Síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636)
10	M	CAOE	Duplicação	Patogênica	15	15q11.2q13.3	arr[GRCh37] 15q11.2q13.3(23,656,946 - 31,557,581)x3	7,90	150	<i>NDN, SNRPN, UBE3A, GABRB3, HERC2</i>	Síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636)
11	M	CAOE	Duplicação	Patogênica	15	15q11.1q13.3	arr[GRCh37] 15q11.2q13.3(22,750,305 - 32,514,341)x3~4	9,76	169	<i>NIPAI, NDN, SNRPN, UBE3A, GABRB3, HERC2</i>	Síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636)
12	H	CAOE	Deleção	Provavelmente patogênica	1	1q44	arr[GRCh37] 1q44(247,455,719- 249,218,992)x1	1,76	71	<i>NLRP3</i>	-
			Duplicação	Patogênica	16	16q22.1q24.3	arr[GRCh37] 16q22.1q24.3(69,586,228- 89,977,739)x3	20,39	225	<i>ATP2C2, AARS, CMIP, COG4, VAC14, FA2H, KARS, WWOX, GCSH, GAN, FBX031, CDH15, SPG7, CHMP1A</i>	-
13	H	SAG	Deleção	Patogênica	16	16p11.2	arr[GRCh37] 16p11.2(29,647,342- 30,192,561)x1	0,54	46	<i>PRRT2, ALDOA</i>	Síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM #611913)
14	M	IC	Deleção	Patogênica	17	17q21.31	arr[GRCh37] 17q21.31(43,693,538- 44,212,727)x1	0,51	16	<i>MAPT, KANSL1</i>	Síndrome de microdeleção 17q21.31 (ou síndrome de Koolen-De Vries) (OMIM #610443)
15	M	CAOE	Deleção	Patogênica	17	17p11.2	arr[GRCh37] 17p11.2(16,660,721- 20,517,074)x1	3,91	118	<i>RAI1, B9DI</i>	Síndrome de microdeleção do 17p11.2 (ou síndrome de Smith-Magenis) (OMIM #182290)

16	H	CAOE	Deleção	Patogênica	18	18p11.32p11.21	arr[GRCh37] 18p11.32p11.21(13,034-15,249,516)x1	15,24	144	<i>TGIF1, AFG3L2</i>	Síndrome de microdeleção 18p (OMIM #146390)
			Deleção	Patogênica	18	18q23	arr[GRCh37] 18q23(76,437,601-78,015,180)x1	1,57	13	<i>CTDPI</i>	-
17	H	SAG	Duplicação	VUS	20	20q11.21	arr[GRCh37] 20q11.21(29,507,776-30,562,017)x3	1,05	24	-	-
18	H	CAOE	Deleção	Patogênica	22	22q11.21	arr[GRCh37] 22q11.21(18,886,915-21,463,730)x1	2,58	82	<i>PRODH, TBX1, COMT, TANGO2, RTN4R, PI4KA, SNAP29</i>	Síndrome de microdeleção 22q11.2 (ou síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial - OMIM #188400)

Tabela 4: Regiões de Homozigose (ROH) encontradas no Paciente 17.

* Genes OMIM importantes em doenças do neurodesenvolvimento, tais como deficiência intelectual, autismo, epilepsia e esquizofrenia.

Cromossomo	Banda cromossômica	Resultado (GRCh37/hg19)	Tamanho (Mb)	Número total de genes	Gene(s) de morbidade importante(s)*
1	1q24.2q32.2	arr[GRCh37] 1q24.2q32.2 (169,658,509-211,230,021)x1	41,57	412	<i>PCH2F, MCPH5, SCZD, FAME5</i>
2	2p16.1p13.3	arr[GRCh37] 2p16.1p13.3(59,711,640-69,994,543)x1	10,28	89	<i>SLC1A4</i>
2	2q12.2q14.2	arr[GRCh37] 2q12.2q14.2(106,250,893-121,937,079)x1	15,67	132	<i>SLC5A7, RANBP2, GLI2</i>
4	4q32.1q34.3	arr[GRCh37] 4q32.1q34.3(158,991,908-181,603,477)x1	22,61	108	<i>MSMO1</i>
8	8q22.1q23.3	arr[GRCh37] 8q22.1q23.3(97,578,672-116,469,207)x1	18,89	116	-
15	15q21.2q26.2	arr[GRCh37] 15q21.2q26.2 (50,555,544-94,711,951)x1	44,16	557	<i>TRPM7, AP4E1, ADAM10, VPS13C, HERC1, EDC3, CDH2</i>
16	16p12.3q12.2	arr[GRCh37] 16p12.3q12.2(16,876,299-55,231,907)x1	38,36	393	<i>ARL6IP1, PRRT2, STX1B, FUS, VPS35, GPT2, FTO</i>
17	17q21.32q24.3	arr[GRCh37] 17q21.32q24.3(47,316,657-70,792,557)x1	23,46	287	<i>CACNA1G, MPO, STRADA</i>
20	20q13.12q13.33	arr[GRCh37] 20q13.12q13.33(44,949,747-62,912,463)x1	17,96	253	<i>ARFGEF2, KCNB1, VAPB, CHRNA4, KCNQ2, EEF1A2</i>

Discussão

V. DISCUSSÃO

V.1 SNP arrays e frequência de alterações cromossômicas

Microarrays cromossômicos (CMA), são sugeridos como primeira linha de investigação para avaliação de pacientes com deficiência intelectual ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DI/ADNPM), autismo e dismorfismos de etiologia desconhecida (Miller et al. 2010; Battaglia et al. 2013; Beaudet 2013; Bartnik et al. 2014; Shin et al. 2015; Uehara et al. 2016). Avanços nestes testes resultaram diretamente na habilidade de examinar o genoma humano a uma resolução aumentada em comparação com a citogenética clássica, permitindo a identificação de desequilíbrios genômicos relativamente pequenos (Beaudet 2013).

Com a aplicação de CMA, a taxa de diagnóstico molecular de pacientes que apresentam DI/ADNPM e cariótipo normal após bandamento G tem aumentado substancialmente, chegando a 15-20% dos casos (Miller et al. 2010).

No presente estudo, *SNP array* foi aplicado na investigação de desequilíbrios genômicos (CNVs) que explicassem o quadro clínico de pacientes com DI. Foram identificadas alterações raras em número de cópias em 18 dos 40 pacientes com DI idiopática analisados. Destes 18, a CNV identificada foi considerada a etiologia do quadro clínico em 12 pacientes (taxa de diagnóstico de 30%). Seis destes pacientes (6/19) apresentaram variantes de significância incerta (*variant of unknown significance* - VUS). Adicionalmente, um paciente, que também apresentou uma VUS, apresentou 9 regiões de homozigose (ROHs) maiores que 10Mb, distribuídas em 8 cromossomos distintos.

É interessante notar que vários dos Pacientes (Pacientes 2, 8, 15, 16 e 18) que apresentaram alterações cromossômicas têm histórico de gestação/parto/desenvolvimento perinatal que poderia ao menos parcialmente justificar a presença de quadro clínico. Esses casos ilustram que atribuir quadro clínico a problemas ambientais exige análise criteriosa, pois é sabido que

alterações cromossômicas, além de estarem associadas a aborto, estão também associadas a complicações gestacionais e de parto, sendo às vezes difícil distinguir causas e consequências.

A taxa de diagnóstico de 30% encontrada neste estudo foi a maior relatada até o momento, muito superior a outros estudos que utilizaram *microarrays* cromossômicos para investigar coortes de pacientes com DI: utilizando *SNP arrays*, Utine e colaboradores (2014) obtiveram uma taxa de 12% (12/100); Pereira e colaboradores (2015) conseguiram estabelecer a etiologia do quadro clínico em três pacientes de sua coorte brasileira que apresentavam DI idiopática (3/15, taxa de diagnóstico de 20%). Recentemente, Uehara et al. (2016) obtiveram uma taxa de diagnóstico mais alta do que reportado na maioria dos estudos, ao utilizar aCGH e *SNP arrays* na investigação de uma grande coorte de pacientes que apresentavam DI e malformações congênitas (155/645 ou 24%), confirmando que a presença de sinais adicionais aumenta a probabilidade de detectar CNVs patogênicas. Já Wang et al. (2016), ao analisarem um grupo de crianças chinesas que apresentava DI associada a malformações congênitas, aspectos dismórficos, convulsões e autismo, identificou 41 CNVs patogênicas em 40 pacientes, obtendo uma taxa de diagnóstico de 14% (40/287).

Vários fatores podem ter contribuído para a alta taxa de alterações cromossômicas identificada na nossa coorte: (a) o número de pacientes estudado foi pequeno, estando mais sujeito a desvios amostrais; (b) a maioria dos pacientes apresentava malformações congênitas associadas, probabilisticamente apresentando maior frequência de alterações; (c) 28 pacientes da nossa amostra (aqueles provenientes do CAO) nunca fizeram cariótipo. Embora seja consenso a utilização do CMA como primeira linha de investigação desses casos, grande parte dos pacientes de países desenvolvidos já haviam sido cariotipados antes de seguirem para a triagem por CMA. Logo, aqueles pacientes que possuíam alterações citogenéticas visíveis ao microscópio, haviam sido previamente excluídos dos estudos. De acordo com a literatura, apenas ~4% dos pacientes com DI idiopática apresentam alterações citogeneticamente detectáveis (excluídos aqui os

pacientes com síndrome de Down), sendo que ~1% destes apresentam rearranjos equilibrados (Hochstenbach et al 2009), não detectáveis por *array*; o aumento na taxa de detecção em nosso estudo foi muito superior a isso. Em nossa coorte, no entanto, uma parte das alterações poderia ter sido detectada em cariótipo após bandamento G (> 8 MB), apresentando uma frequência surpreendentemente alta (5/19 ou 26%) de alterações cromossômicas quando comparada às reportadas na literatura; excluídos esses pacientes com alterações citogeneticamente detectáveis, teríamos 7 alterações em 35 pacientes (20%), frequência ainda alta, mas compatível com os dados da literatura.

Um número crescente de desequilíbrios genômicos reportados que apresentam expressão variável ou penetrância incompleta impõem um grande desafio para determinar os riscos de recorrência das CNVs encontradas e, consequentemente, para o aconselhamento genético (Vissers et al. 2010). Sendo assim, ao identificar uma CNV rara em um paciente, além do conteúdo gênico, podem estar associados expressividade variável, efeito pleiotrópico e penetrância incompleta, dificultando os cálculos de risco de recorrência e aconselhamento genético (Grayton et al. 2012; Resta e Memo 2012; Beaudet 2013). Por exemplo, a síndrome de microduplicação 22q11.2 apresenta expressão fenotípica altamente variável e os indivíduos portadores da duplicação variam de assintomáticos até casos graves (Digilio et al. 2005). A microdeleção 16p11.2, identificada no Paciente 13, é um fator de risco para o autismo e exibe penetrância incompleta e expressividade variável (Ciuladaité et al. 2011). É importante notar que nos dois exemplos dados, as CNVs podem ter sido herdadas de portadores assintomáticos.

As estimativas acuradas da penetrância são importantes para determinar os riscos de recorrência de doenças genéticas em famílias que apresentam doenças mendelianas com penetrância incompleta segregando, ou para o estabelecimento de localizações de mapas genéticos através de análise de ligação (Horimoto et al. 2010). Estimativas empíricas para a penetrância com base na frequência de CNVs patogênicas encontradas em pacientes e em familiares portadores normais podem ser utilizadas para auxiliar no

aconselhamento genético (Cooper et al. 2011; Rosenfeld et al. 2013; Coe et al. 2014). Embora o aconselhamento deva incluir, se disponível, informação sobre a variedade de possíveis progressões fenotípicas, a estimativa da penetrância evidencia que nem todas as CNVs conferem um risco igual ao seu portador (Rosenfeld e Patel 2017). Por exemplo, pacientes portando a deleção 15q11.2 tem uma probabilidade de 90% de apresentarem um fenótipo normal, quando comparado à 50% de chance daqueles pacientes que apresentam uma deleção proximal 16p11.2 (Rosenfeld et al. 2013). Infelizmente, é difícil identificar os fatores que regulam penetrância e expressividade, podendo variar com sexo, background étnico, etc (Jacquemont et al. 2014; Polyak et al. 2015).

Muitas CNVs recorrentes apresentam expressividade variável não apenas na intensidade mas também na apresentação clínica; por exemplo, a mesma CNV pode ser identificada em populações de pacientes com DI, autismo e esquizofrenia. Tais efeitos podem indicar que doenças do neurodesenvolvimento que são consideradas clinicamente distintas compartilham sua etiologia (Rosenfeld e Patel 2017).

Para interpretação clínica precisa, a documentação extensiva de CNVs raras e seus fenótipos associados em bancos de dados é de grande importância, não somente para a confirmação da patogenicidade, mas também para o correto aconselhamento do paciente e de seus familiares (Vissers et al. 2010). Tais bancos de dados, como DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk>) e ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>), que documentam CNVs em pacientes, e DGV (<http://dgv.tcag.ca>), que compila estudos de população controle, são instrumentos fundamentais para interpretar CNVs identificadas em pacientes.

Conseguir um diagnóstico acurado da DI, após a análise por CMA, oferece vários benefícios, incluindo (a) a não necessidade de testes diagnósticos adicionais; (b) a habilidade de dar uma informação precisa sobre a condição e a sua história natural aos pais e profissionais envolvidos com o cuidado do paciente; (c) o encaminhamento a um centro especializado (nos países onde existem e para aqueles pacientes com possibilidade de acesso a eles); (d) acompanhamento específico e prevenção de complicações; (e) o

aconselhamento genético preciso (risco de recorrência e opções para o diagnóstico pré-natal) aos familiares; e (f) acesso mais fácil a outras fontes de ajuda, se disponíveis, tais como associações de pais, serviços sociais e o sistema de educação (Resta e Memo 2012).

Uma proporção substancial de pacientes com DI apresenta desequilíbrios cromossômicos. Embora algum desses desequilíbrios resultem em um fenótipo bem caracterizado levando a um diagnóstico pelo geneticista clínico, um número significativo de pacientes com síndromes conhecidas acaba não sendo detectado nesse primeiro momento (Kirchhoff et al. 2007). A expansão do uso de ferramentas de análise cromossômica global, tais como os CMAs, para a testagem na pesquisa científica e no diagnóstico clínico de pacientes que apresentam DI, tem levado a um contínuo crescimento na descoberta de rearranjos genômicos associados a uma variedade de doenças e à identificação de muitas novas síndromes de microduplicação e microdeleção (Slavotinek 2008; Weise et al. 2012; Nevado et al. 2014).

V.2 SNP arrays e a detecção de síndromes de microdeleção/microduplicação bem caracterizadas

No presente estudo, nove pacientes apresentaram alterações no número de cópias que caracterizavam síndromes de microduplicação/microdeleção já conhecidas, o que corresponde a 50% (9/18) dos pacientes com CNVs raras do estudo. Especificamente: síndrome de microdeleção 1p36 (OMIM #607872) (veja Artigo 1, seção V.5 - página 96), síndrome de microduplicação 15q11q13 (OMIM #608636) (veja Artigo 2, seção V.5 - página 114), síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM #611913), síndrome de deleção 17p11.2 (ou síndrome de Smith-Magenis) (OMIM #182290), síndrome de microdeleção 17q21.31 (ou síndrome de Koolen-De Vries - OMIM #610443), síndrome de deleção 18p (OMIM #146390) e síndrome de microdeleção 22q11.2 (ou síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial - OMIM #188400). O mapeamento dessas alterações encontradas nos pacientes de nossa coorte são compatíveis com as alterações recorrentes classicamente descritas para as síndromes..

A análise do SNP *array* do Paciente 13 detectou uma microdeleção de 0,54 Mb na região 16p11.2; essa deleção é uma alteração recorrente que caracteriza a síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM #611913) e está associada a um fenótipo clínico extremamente variável podendo incluir, entre outros, DI leve a moderada, convulsões, dismorfismos, microcefalia, anomalias cardíacas e catarata, além de obesidade (Kumar et al. 2008; Walters et al. 2010; Ciuladaitė et al. 2011; Schaaf et al. 2011). Sobretudo, essa deleção tem sido associada à predisposição a um amplo espectro de problemas neurocomportamentais, incluindo DI/ADNPM, transtorno de déficit de atenção, hiperatividade, autismo e esquizofrenia (Ciuladaitė et al. 2011). O Paciente apresenta características clínicas compatíveis com a síndrome, tais como atraso no desenvolvimento da linguagem, DI e hiperatividade.

A penetrância incompleta e a expressividade variável nos pacientes portadores da deleção podem estar relacionadas a polimorfismos ou mutações no alelo hemizigoto ou a diferentes fatores genéticos no genoma (Ciuladaitė et al. 2011). Em um estudo (Walters et al. 2010) com pacientes que possuíam déficit cognitivo ou anomalias comportamentais, aqueles pacientes que portavam a deleção 16p11.2 apresentavam um fenótipo de obesidade. Foi também detectada uma penetrância dependente da idade dos pacientes, ou seja, pacientes adultos portando a deleção apresentavam um fenótipo de obesidade, enquanto que em crianças e em jovens esse fenótipo era mais variável (Walters et al. 2010). O Paciente 13 não apresentava obesidade.

A penetrância incompleta e a expressividade variável dos achados clínicos nos pacientes com a microdeleção complica tanto a interpretação clínica dos dados moleculares quanto o aconselhamento genético. Os pais do paciente ainda não foram testados para saber se são portadores da microdeleção.

A Paciente 14 apresenta uma deleção de ~450 Kb, alteração recorrente que caracteriza a síndrome de microdeleção 17q21.31, também conhecida como síndrome Koolen-De Vries (OMIM #610443). É uma condição multissistêmica, com prevalência de 1-16.000 nascimentos vivos, caracterizada por atraso no desenvolvimento, DI, hipotonia, dismorfismos faciais e

malformações congênitas em múltiplos órgãos (Koolen et al. 2006; Shaw-Smith et al. 2006; Koolen et al. 2008). Adicionalmente, cerca de 50% dos casos apresentam defeitos estruturais no cérebro (agenesia do corpo caloso, dilatação ventricular), coração (estenose aórtica e/ou pulmonar, defeitos do septo atrial e ventricular) e sistema geniturinário. Sinais secundários também podem incluir problemas musculoesqueléticos, anomalias dentárias e problemas de pigmentação da pele (Koolen et al. 2006, 2008; Dubourg et al. 2011). A Paciente 14 apresenta características faciais (tais como nariz tubular, dedos afilados, palato alto e estrabismo) e problemas cardíacos (miocardiopatias; defeitos nas válvulas septais e nas válvulas bicúspedes; insuficiência mitral; artéria subclava anômala) típicos da síndrome (Dubourg et al. 2011; Moreno-Igoa et al. 2015).

A região da deleção, que primeiramente havia sido definida como um segmento de 424 Kb (Koolen et al. 2008), inclui os genes *MAPT*, *STH* e *KANSL1* (Dubourg et al. 2011). Recentemente, foi demonstrado que a haploinsuficiência do *KANSL1* por si só, devido a mutações de ponto ou deleção gênica, é suficiente para causar o fenótipo clássico da doença (Moreno-Igoa et al. 2015; Koolen et al. 2016).

A Paciente 15 apresentou uma deleção de ~3,9 Mb em 17p11.2. Essa deleção está presente em cerca de 70% dos pacientes com a síndrome de Smith-Magenis, enquanto deleções variando de 1,5 a 9 Mb são observadas em um número menor de pacientes (SMS; OMIM #182290). A SMS é caracterizada por anomalias congênitas múltiplas e grau de deficiência intelectual variável, e pode se apresentar associada a distúrbios do sono, anomalias esqueléticas, craniofaciais e neurológicas, obesidade, e por um número de comportamentos distintos que incluem auto injúria, agressão, e estereotipias (Gropman et al. 2007; Elsea e Williams 2011; Alaimo et al. 2015). É tipicamente *de novo*, com uma prevalência estimada de 1:15.000-25.000 nascimentos vivos (Elsea e Girirajan 2008; Elsea e Williams 2011).

Muitos genes foram mapeados na região crítica da SMS 17q11.2 e a função exata de muitos deles ainda permanece desconhecida (Girirajan et al. 2006; Elsea e Williams 2011). A haploinsuficiência de vários genes pode

contribuir para o fenótipo da síndrome, mas a haploinsuficiência de *RAI1*, localizado dentro da região crítica mínima de deleção, é considerado como o principal responsável pela SMS (Slager et al. 2003; Elsea e Girirajan 2008; Vilboux et al. 2011). De fato, pacientes com mutações no gene *RAI1* exibem quase todas as características principais da síndrome, indicando que o gene é sensível a dose e responsável por muitos dos sintomas. Microdeleções são responsáveis por 90% dos casos de SMS, ao passo que 10% dos pacientes possuem mutações de ponto ou pequenas deleções causando a haploinsuficiência de *RAI1* (Elsea e Girirajan 2008; Elsea e Williams 2011; Gupta et al. 2016).

Pouco se sabe sobre a função do gene *RAI1* em humanos. *RAI1* parece ser uma proteína nuclear e exibe atividade de fator de transcrição (Carmona-Mora et al. 2010). Um estudo recente em camundongos indica que a perda de *RAI1* em diferentes subtipos neuronais origina fenótipos semelhantes à SMS, com déficits nas funções motoras e de aprendizagem, além de ocasionar obesidade (Huang et al. 2016).

O diagnóstico baseado em exame clínico da SMS é difícil, pois as características clínicas são semelhantes a outras síndromes. Por exemplo, distúrbios do sono, DI e problemas cardíacos, sinais encontrados em pacientes com SMS, também estão presentes em pacientes com a síndrome de deleção 9q34 (Kleefstra et al. 2009); comportamento obsessivo compulsivo, baixa estatura e auto-injúria também são sinais clínicos presentes em pacientes com a síndrome de Prader-Willi (Cassidy et al. 2011). Perda de audição, dificuldade para se alimentar e DI também são características presentes na síndrome 22q11.2 (Swillen e McDonald-McGinn 2015). A Paciente estudada apresenta ADNPM, perda de audição, atraso no desenvolvimento da fala e dismorfismos faciais (ponte nasal ampla e hipoplasia da face média) – embora características típicas de SMS, são também encontradas em outras síndromes; o uso de CMA foi essencial para estabelecer a etiologia do quadro clínico da Paciente.

O Paciente 16 apresentou duas deleções terminais do cromossomo 18, uma de 1,58 Mb (em 18q23) e outra de 15,24 Mb (em 18p11.32p11.21), resultado sugestivo da presença de um cromossomo 18 em anel, o que foi

comprovado por experimentos de FISH. Cromossomos em anel são geralmente originados após quebras nos braços curto e longo, com perda de telômeros, com fusão nos pontos de quebra. São normalmente acompanhados pela perda dos segmentos cromossômicos distais aos pontos de quebra. O fenômeno pode ocorrer em qualquer cromossomo humano, embora seja mais comum a ocorrência nos cromossomos 13 e 18 (Mohamed et al. 2001).

O fenótipo dos portadores de cromossomos em anel do 18, ou r(18), pode estar associado a aspectos de ambas as síndromes de deleção 18q e 18p, dependendo dos pontos de quebra (Stankiewicz et al. 2001). O segmento deletado no braço curto é muito maior e, provavelmente, impacta mais o fenótipo do paciente. A deleção parcial ou total do braço curto do cromossomo resulta na síndrome de deleção 18p (OMIM #146390), uma síndrome rara que afeta 1:50.000 nascimentos vivos. Foi primeiramente descrita por Grouchy et colaboradores em 1963 (Maranda et al. 2006; Turleau 2008; Babaji et al. 2014). Pacientes com deleção 18p podem ter uma ampla variação de manifestações clínicas, desde assintomáticos até aqueles com dismorfismos faciais e dificuldade de aprendizagem/DI grave (Maranda et al. 2006; Wester et al. 2006; Fernández and Rojas 2009; Koshy et al. 2011).

As anomalias mais frequentes consistem no atraso no crescimento (leve a moderado) devido à deficiência de hormônio de crescimento (GH), DI, microcefalia, ptose, dobras epicânticas, ponte nasal baixa, hipertelorismo e orelhas grandes e protuberantes, anomalias cardíacas congênitas, doenças autoimunes (tais como lúpus, artrite reumatoide, doença celíaca, entre outras) e holoprosencefalia (Turleau 2008; Hasi-Zogaj et al. 2015). O grau de dificuldade de aprendizagem e, conseqüentemente, de DI nessa síndrome é dependente do tamanho do segmento deletado (Wester et al. 2006). No presente estudo, o Paciente 16 apresenta problemas acentuados de aprendizagem e não fala.

O Paciente 18 apresenta uma deleção intersticial de 2,58 Mb em 22q11.21, que caracteriza a síndrome de microdeleção 22q11.2 (ou síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial) (OMIM #188400), a síndrome de microdeleção mais comum, afetando 1 em 2.000-4.000 nascimentos vivos. É uma das

síndrome mais bem caracterizadas, envolvendo a haploinsuficiência de 50 genes e resultando em uma doença multissistêmica (Botto et al. 2003; Oskarsdóttir et al. 2005).

A expressividade da síndrome 22q11.2 é extremamente ampla. Aspectos clássicos incluem defeitos cardíacos congênitos, em particular anomalias conotruncais; anomalias do palato (mais frequentemente incompetência velofaríngea), dos membros e da coluna; imunodeficiência; hipocalcemia, devido a hipoparatiroidismo; problemas no trato geniturinário; atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; problemas de aprendizagem e fala; esquizofrenia; convulsões; e anomalias faciais (Digilio et al. 2005; Maeder et al. 2016).

O Paciente 18 apresenta problemas na fala, possui déficit de atenção e ataques epiléticos, características que se enquadram nos sinais clássicos da doença. Niklasson e colegas (2009), em um estudo com 101 pacientes que apresentavam a deleção de 22q11.2, sugerem que cerca de 30% desses pacientes têm algum tipo de déficit de atenção e/ou problemas de hiperatividade (Niklasson et al. 2009). Com relação à epilepsia, a incidência de ataques foi reportada em 15-21% dos casos de pacientes com deleção do 22q11.1 (Kim et al. 2016). É provável que as complicações gestacionais e perinatais tenham agravado os problemas de desenvolvimento neuropsicomotor associados à síndrome em nosso paciente.

Cerca de 80-90% das deleções 22q11.2 ocorrem *de novo*. Casos herdados, na maioria das vezes, possuem pais levemente afetados ou aparentemente normais (Besseau-Ayasse et al. 2014), o que implica em risco de recorrência em eventual futura prole dos genitores. Os experimentos de FISH (Figura 22C-D) dos genitores fenotipicamente normais evidenciaram que o paciente apresenta uma deleção *de novo*.

V.3 Outras CNVs patogênicas

Três pacientes apresentaram CNVs que foram consideradas patogênicas, embora não associadas a síndromes descritas no banco de dados OMIM ou bem caracterizadas na literatura, sendo eles os Pacientes 5, 8 e 12. O critério de classificação de patogenicidade foi baseado no tamanho (>3 Mb) (Lee et al. 2007) ou envolvendo regiões genômicas de relevância clínica conhecida (genes OMIM) compatíveis com o fenótipo do paciente (D'Amours et al. 2014).

O Paciente 5 apresentou uma deleção na região 7q36.2q36.3, compreendendo 32 genes, dos quais um deles é reportado como importante no neurodesenvolvimento: *SHH*. No entanto, a alta frequência de haploinsuficiência na população geral (DGV) indica que sua deleção não deva ser a causa do quadro clínico.

O Paciente 8 é portador de uma deleção de 13,05 Mb em 11q41.1q25: a Alteração foi considerada patogênica devido ao seu grande tamanho e por afetar vários genes que, quando em haploinsuficiência, podem acarretar problemas cognitivos, dentre eles o gene *KIRREL3* (Guerin et al. 2012).

O Paciente 12 apresentou duas alterações no número de cópias. A primeira, uma duplicação terminal de 20,39 Mb em 16q22.1q24.3. E a segunda, uma deleção terminal de 1,76 Mb na região 1q44.

Pacientes que apresentam duplicações em 16q frequentemente apresentam DI/ADNPN, características dismórficas (tais como rosto arredondado, pregas epicânticas, baixa implantação das orelhas, ponte nasal alargada, lábio superior mais fino, boca pequena e pescoço curto), problemas na fala, dificuldade de aprendizagem e problemas comportamentais, associados ou não a doenças neuropsiquiátricas (Brisset et al. 2002; Barber et al. 2006; Lonardo et al. 2011; Odak et al. 2011; Rudd et al. 2015). Pacientes com duplicações mais distais, como as encontradas em (Rudd et al. 2015) (duplicação de 16,7 Mb em 16q22.3q24.3) e (Brisset et al. 2002) (trissomia

parcial de 16q24qter), também apresentam uma variedade de problemas de desenvolvimento e de órgãos.

A duplicação em 16q22.1q24.3 abrange 225 genes, e vários deles com associações prévias a doenças neuropsiquiátricas (esquizofrenia ou autismo), DI e problemas relacionados ao desenvolvimento da fala e da linguagem (Tabela 3). Dois genes importantes (*ATP2C2* e *CMIP*) encontrados na região duplicada já foram associados a problemas de memória, linguagem e fala (Newbury et al. 2009; Newbury e Monaco 2010; Gialluisi et al. 2016).

Embora o Paciente 12 não possuísse dismorfismos faciais evidentes, ele apresentava atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, problemas comportamentais (agressividade), problemas relacionados a aprendizagem (dificuldade de leitura e escrita) e a atenção. Embora os genes *ATP2CP2* e *CMIP* possam estar associados às características clínicas encontradas, a duplicação de muitos megabases vista no SNP *array* abrange muitos outros genes também podem estar associados ao fenótipo do paciente.

Ainda que o SNP *array* tenha revelado duas alterações cromossômicas no Paciente 12, o experimento de FISH (Figura 15E) não detectou nenhuma alteração, ou seja, a análise demonstrou dois sinais para cada uma das sondas em ambos os cromossomos 1 e 16. Considerando-se que o SNP *array* e o FISH foram feitos com tecidos distintos (saliva e sangue, respectivamente), a alteração em questão pode estar em mosaico (em uma frequência bem abaixo da detectada por ambas as metodologias); novas amostras devem ser coletadas para esclarecer essa discrepância.

V.4 Alterações de significado incerto

No presente estudo, seis de 40 pacientes analisados apresentaram variantes de significado incerto (*variants of unknown significance* – VUS) (Pacientes 1, 3, 4, 6, 7 e 17). As VUS consistem em achados cujos dados disponíveis são insuficientes para classificá-los de forma inequívoca como clinicamente significantes ou benignos. Obviamente, aquelas CNVs com

penetrância incompleta ou expressividade variável são mais difíceis de serem claramente associadas como causa de fenótipo e requerem uma maior quantidade de dados documentados (Westerfield et al. 2014).

Ao tentar detectar a etiologia genética para DI/ADNPN, a identificação de uma VUS não é incomum e representa um problema para o aconselhamento genético, comprometendo predição do risco de recorrência, detecção de portadores e diagnóstico pré-natal (Boggula et al. 2015).

Pyatt e Astbury (2011), de uma série consecutiva de 1998 casos submetidos a análise de aCGH, encontraram 563 VUS em 490 pacientes (24,5% dos casos). Boggula e colaboradores (2015) encontraram 31 VUS em 17 pacientes com DI. Recentemente, Hollenback e colaboradores (2016) identificaram, em uma coorte de 4.417 pacientes apresentando DI/ADNP, aspectos dismórficos ou anomalias congênitas, 5% dos pacientes apresentando 1 ou 2 VUS (221/4417) (Hollenbeck et al. 2016). Já Wang e colaboradores (2016) detectaram apenas 1,7% de VUS em 287 pacientes analisados (6 VUS em 5 pacientes).

A análise de amostras dos pais sempre ajudar a definir o significado de uma VUS detectada na criança. Uma alteração de novo favorece uma interpretação de patogenicidade da VUS. Por outro lado, o fato de uma VUS ser herdada de um genitor não afetado apenas indica que a variante, por si só, é insuficiente para explicar o quadro clínico. No entanto, não exclui a contribuição da variante no fenótipo identificado na criança. Contudo, se o fenótipo normal de algum dos pais está em questão, ou não pode ser firmemente estabelecido, adicional análise do heredograma familiar pode ajudar no rastreamento da ocorrência do fenótipo e da herança da alteração (Pyatt e Astbury 2011). A falta de dados dos pais limita a interpretação do significado clínico da VUS (Klugman et al. 2014).

Embora a identificação de uma VUS na busca de um diagnóstico não permita aos familiares obterem respostas claras, é importante que sejam reportadas porque contribuem para eventualmente caracterizar síndromes novas ou genes candidatos associados a anomalias congênitas isoladas (Emy

Dorfman et al. 2015). Adicionalmente, enquanto uma variante é considerada VUS no presente, seu significado pode ser re-avaliado depois de um período e resultar em reclassificação como benigna ou patogênica.

O Paciente 17 apresentou, além da VUS em 20q11.21 (Tabela 3), nove regiões de homozigose (ROH) distribuídas em oitos cromossomos (cromossomos 1, 2, 4, 8, 15, 16, 17 e 20) (Tabela 4). Uma ROH é um contínuo ou não interrompido trecho de um segmento de DNA sem heterozigose no estado diploide, ou seja, na presença de ambas as cópias do segmento de DNA homólogo (Ku et al. 2011).

As ROH encontradas variaram de 10,28 até 41,57 Mb. O *threshold* utilizado para reportar ROHs foi de, no mínimo, duas ROH >5 Mb ou uma ROH >10 Mb. Este limiar foi baseado em trabalhos anteriores demonstrando que ROH >10 Mb são raramente vistas em populações cosmopolitas e que populações não endogâmicas dificilmente apresentam ROH >4 Mb (McQuillan et al. 2008; Kirin et al. 2010). É importante salientar que não existem estudos similares em populações brasileiras. Dependendo do contexto, a ROH pode indicar homozigose ancestral, dissomia uniparental (UPD) ou consanguinidade parental (Kearney et al. 2011). Como nosso Paciente apresentava múltiplas ROHs em diferentes cromossomos, consideramos como indicação de presença de consanguinidade, o que está de acordo com o fato dos pais serem primos em primeiro grau - informação essa fornecida pelos próprios.

SNP *arrays* são um importante ferramenta de diagnóstico para identificar tanto CNVs quanto ROH em pacientes apresentando uma ampla variedade de indicações clínicas (Kearney et al. 2011; Fan et al. 2013; Wang et al. 2015).

É bem sabido que a consanguinidade está associada a um elevado risco de anomalias e doenças autossômicas recessivas (Modell e Darr 2002; Meyer 2005; Hamamy et al. 2011; Saad et al. 2014). Em 2011, um grupo de pesquisadores se juntou em um Workshop Internacional para discutir o impacto da consanguinidade na saúde pública. O grupo frisou a importância de recomendações para o aconselhamento genético de casamento consanguíneo e o comprometimento de ambas as áreas de pesquisa genômica e social em

definir as várias influências e o efeito da consanguinidade (Hamamy et al. 2011).

A frequência de casamento consanguíneos pode variar significativamente entre as regiões geográficas (Hamamy et al. 2011; Fan et al. 2013; Saad et al. 2014). No Brasil, as taxas de casamentos consanguíneos são heterogêneas, aumentando da costa para o interior do país. A região sul é caracterizada por uma frequência relativamente baixa, enquanto que a nordeste tem os maiores coeficientes (Machado et al. 2013). Em um estudo feito com a população do Estado da Paraíba (cerca de 20.462 entrevistados), a taxa de casamento consanguíneo variou de 6 a 41% (Weller et al. 2012).

O Paciente 17, além de ADNP, apresenta surdez bilateral profunda, não engatinha (e fica em pé somente com apoio), possui vários dismorfismos faciais (face com bossa frontal, sobrelhas largas, hemangioma em glabella, olhos com inclinação para cima das fendas palpebrais, nariz pequeno, fenda palatina posterior, retrognatia, orelhas com baixa implantação, com anti-hélices proeminentes e fusão da hélice e anti-hélices), além de criptorquidia e polegares adutos. O tamanho das ROHs resulta em um enorme número de genes, com função conhecida em fenótipos ou não, o que dificulta a busca de genes específicos que podem serem responsáveis pelo quadro clínico do Paciente.

Enquanto o grande número de blocos em homozigose no Paciente 17 esteja associado a uma alta probabilidade de que alelos patogênicos em homozigose causem quadro clínico, não podemos excluir a contribuição da VUS no fenótipo.

Vinte e dois pacientes (22/40) do presente estudo não apresentaram alterações no número de cópias (ou apresentaram CNVs benignas). Sendo assim, utilizando-se *SNP array*, obtivemos nenhuma indicação da etiologia genética para 55% dos casos de pacientes com DI idiopática.

Embora o CMA dê uma informação global de ganhos e perdas do genoma, resultados normais não afastam a possibilidade de anomalias

cromossômicas: sabidamente, CMA não detecta rearranjos que não resultem em ganho ou perda do material genético (por exemplo, inversões ou translocações recíprocas e robertsonianas), embora rearranjos equilibrados respondam por uma fração muito pequena dos fenótipos alterados. Tampouco aberrações menores do que a resolução do *array* (Shaffer e Bejjani 2004; Beaudet 2013) e mutações pontuais não são detectadas (Beaudet 2013). Adicionalmente, alterações presentes em menos de 30% das células (mosaico baixo) podem não ser detectadas.

Atualmente, para ultrapassar as limitações encontradas nos CMAs, muitas pesquisas têm usado sequenciamento de próxima geração (sequenciamento de exoma ou de genoma) em pacientes com DI idiopática (Kahrizi et al. 2011; Topper et al. 2011; de Ligt et al. 2012; Gilissen et al. 2014; Giorgio et al. 2016). Painéis multigênicos também são utilizados para o sequenciamento de mutações em genes conhecidos que causam DI, sendo que alguns focam em genes XLID, enquanto que outros focam em causas autossômicas (Carvill e Mefford 2015). Gilissen e colaboradores (2016), utilizando-se do sequenciamento do genoma global em uma coorte de pacientes com DI, identificaram variantes patogênicas em 60% dos pacientes estudados. Sendo assim, outras técnicas mais elaboradas devem ser utilizadas para tentar buscar a etiologia genética nos pacientes com DI idiopática, quando o CMA não apresentar resultados satisfatórios.

V.5 SNP arrays na elucidação de estruturas cromossômicas e mosaicismo

No decorrer desse projeto ficou evidenciado que SNP arrays provêm informações que frequentemente vão além do número de cópias: em um indivíduo sem alterações, cada *locus* polimórfico (SNP) é representado por 2 alelos originados de diferentes genitores, apresentando 3 genótipos possíveis, AA, AB ou BB. Mais importante, os loci AB (heterozigotos), estão exatamente na proporção 50%, evidenciando que os diferentes alelos maternos e paternos estão em número igual. Duplicações, triplicações, deleções, mosaicismo e UPD

alteram essas proporções. Portanto, o balanço alélico é altamente informativo de alterações em número de cópias e seus mapeamentos, assim como da presença de diferentes populações celulares. Os dois trabalhos discutidos a seguir, baseados em pacientes de nossa coorte, ilustram o potencial dessa metodologia. O primeiro deles (página 96) será submetido em breve e ilustra a suposta ocorrência de múltiplas capturas de telômero por um cromossomo 1 com deleção terminal do braço curto de segmentos terminais de 1p do homólogo normal. O segundo (página 114), ainda em elaboração, discute os possíveis mecanismos envolvidos em aumento recorrente no número de cópias da região 15q11q13.

ARTIGO 1**Repetitive telomere capture as a novel mechanism for stabilizing a human 1p36 terminal deletion resulting in extensive mosaicism within and between tissues of the same patient.**

Alexsandro dos Santos¹, Francine Campagnari¹, Ana Victorino Krepischi¹,
Maria de Lourdes Ribeiro Câmara², Rita de Cássia E. de Arruda Brasil², Ligia
Vieira¹, Peter L Pearson¹ and Carla Rosenberg^{1,*}

1 - Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

2 - Center of Odontological Assistance to patients with special needs, Faculty of
Odontology, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Carla Rosenberg
Department of Genetics and Evolutionary Biology
Institute of Biosciences
University of São Paulo
Rua do Matão, 277
São Paulo, Brazil
Telephone: (11) 30917573
email: carlarosenberg@uol.com.br

ABSTRACT

A complex mosaicism of the short arm of chromosome 1 detected by SNP microarray analysis is described in a patient presenting a 4Mb 1p36 terminal deletion and associated phenotype features. The most likely explanation for the complex mosaicism was a series of events initiated in either a gamete or early embryo producing a 1pter deletion followed by multiple, independent telomere capture events involving somatic recombination with the normal 1p homologue, resulting in various segments of partial uniparental disomy (PUPD) of 1p. The largest segment captured involved the entire 1p in buccal mucosa and other capture events occurred in at least 4 other distal regions in both blood and buccal mucosa, demonstrating that most of the changes occurred in a precursor of blood and buccal mucosa. The frequency differences of PUPD between blood and buccal mucosa observed for various segments of 1p are most easily explained by the entire 1p capture being present in buccal mucosa and apparently absent in blood. This additively increases the frequency of PUPD mosaicism in buccal mucosa relative to blood. Previous articles of telomere capture have been restricted to singleton events in separate patients. This is the first description of multiple independent telomere capture events involving the telomere and various segments of the homologous 1p to repair the same initial lesion in a single patient, leading to complex mosaicism of PUPD distributed over the two tissues studied. We estimate that at least five independent telomere captures have occurred in the same patient.

Words 241, characters without spaces 1311. Characters with spaces 1552

INTRODUCTION

Monosomy 1p36 (OMIM #607872) is a congenital malformation syndrome caused by a variably sized subtelomeric deletion of the short arm of chromosome 1 (1). Deletions of 1p36 are recognized as the most common terminal chromosomal deletions in humans and have an estimated incidence of 1:5000–1:10,000 (2).

Patients presenting 1p36 deletion manifest cognitive impairment and characteristic facial features. They may also present other clinical features such as seizures, growth and hearing impairment, hypotonia, and heart defects (3). Although the deletion sizes and breakpoints are variable among patients, the core clinical manifestations are fairly consistent between them (4).

Four classes of chromosome rearrangements in individuals with monosomy 1p36 have been identified: derivatives of unbalanced translocations; interstitial deletions; apparently simple terminal truncations; and complex rearrangements. Simple terminal truncations, in which a portion of 1p36 is lost along with the telomere, are the least complex and 67% of *de novo* rearrangements are apparently simple terminal truncations at the DNA sequence level (3,5).

Eukaryotic chromosome stability relies on the presence of intact telomeres (6) and, unless adequately repaired, telomere loss generates senescence, and/or apoptotic cell death (7).

Terminal deletions can be stabilized by acquiring new telomeres by specific mechanisms such as "telomere capture" where a terminally deleted chromosome acquires a new telomere sequence usually from a chromatid of a normal homologous chromosome, and much less frequently from a heterologous chromosome. A common feature of telomere capture is that not only is the telomere region itself captured, but also variable lengths of the same chromosome arm are transferred, effectively creating a partial uniparental disomy (PUPD) of the chromosome arm involved. In these cases, the gain of a functional telomere presumably out-weighs the disadvantage of creating a higher proportion of the donor chromosome segments relative to the receiving homologue (8). Alternatively, terminal deletions can be stabilized by "telomere healing", in which telomerase adds telomeres directly to the ends of broken chromosomes, denominated "neo-telomeres" (9,10).

Additionally, but much less frequently, terminal deletions can also be stabilized by ring chromosome formation (13) or entering a breakage-fusion-bridge cycle (14).

Here, we describe a patient presenting a terminal 1p36 deletion and a complex mosaic segmental uniparental disomy of the non-deleted part of 1p ascertained by SNP array analysis. The SNP allele heterozygosity frequency shows that the proportion between the two chromosome 1 homologues increasingly deviates from 50% from the pericentromeric 1p12 region towards the 1p36 deletion breakpoint, revealing a mosaic UPD of different segment sizes. We hypothesize that the cline of increasing segmental PUPD observed in the microarray analysis from 1cen to 1pter is the additive effect of several independently derived cell lines carrying different segment lengths of UPD extending from 1pter towards the centromere being present in the two tissues studied (blood and buccal mucosa).

PATIENT AND METHODS

Clinical report

The Patient was a 26-year-old male born of healthy and non-consanguineous parents. The pregnancy was uncomplicated and was delivered by cesarean section. At his birth, his father was 21 and mother 20 years old, respectively. His older brother is healthy and his mother had a spontaneous abortion at approximately four weeks gestational age. Parents report a first-degree cousin presenting severe intellectual disability. The Patient presented developmental delay, intellectual disability, seizures and delayed speech which in retrospect correspond to features of 1p36 deletion syndrome.

Consent statement

Written informed consent for publication was obtained from the parents of the Patient.

Samples

A saliva sample from the Patient and blood specimens from Patient and parents were obtained for molecular and cytogenetic studies.

SNP array

DNA was isolated using phenol-chloroform standard laboratory protocol. Patient DNA samples both from saliva and blood, and blood DNA samples from the parents were hybridized according to the supplier's instructions to a CytoSNP 850K BeadChip (Illumina, USA), which contains 850,000 SNP probes covering the whole-genome. Data were analyzed using BlueFuse Multi 4.0 Software (BlueGnome Ltd. Cambridge, UK), and log R Ratio and B Allele Frequency (BAF) values were plotted along chromosomal coordinates. The program calls regions with copy number or allele frequency alterations

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Metaphase chromosome spread preparations were obtained from lymphocyte cultures of peripheral blood according to standard protocols. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed in chromosome preparations of both parents and patient with the specific BAC probe RP11-465B22, which maps inside the 1p36 region deleted in the Patient, labeled with biotin. A chromosome 1q44 probe (CTB-160H23) served as a control and was labeled with digoxigenin. Both probes are part of a 1 MB BAC/PAC set donated by Dr. Nigel Carter (Sanger Center, Wellcome Trust) and can be visualized in the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>). The bacterial hosts were cultured. BAC DNAs were purified and used as probes. Biotin or digoxigenin-labeled probes were generated using a nick translation labeling mix (Biotin/DIG Nick Translation Mix, Roche, Germany) according to the manufacturer's procedures. Immunodetection was carried out using both sheep-anti-digoxigenin-Rhodamine (red) and avidin fluorescein (green) (Roche, Germany).

The telomeric probe used was kindly provided by *Dr Yatiyo Yonenaga-Yassuda* (University of São Paulo, Brazil). This probe is a PCR derived TTAGGG telomeric hexanucleotide indirectly labeled with biotin. Immunodetection was carried out using avidin/fluorescein (Roche, Germany).

The slides were mounted with vectashield medium containing DAPI and fluorescent signals visualized with a Zeiss Axiophote microscope and captured using ISIS software.

RESULTS

The SNP array analysis of the patient showed a 4 Mb terminal deletion at 1p36.33p36.32 (82,154-4,111,187) (Figure 1). As expected in the presence of a single copy, there is no heterozygosity in the deleted area. Moreover, the B-allele frequency (BAF) plot (Fig 1A and 1B for buccal mucosa and blood, respectively) shows a cline of increasing divergence in the heterozygote of the A and B alleles frequency from the pericentromeric 1p12 region towards the subtelomeric 1p36 deletion breakpoint. The image shows that, in addition to the homozygous AA and BB genotypes, the heterozygous genotypes diverged in frequency from the expected 50% proportion as the position moves from the centromere towards the sub-telomeric region, demonstrating that the SNP allele distribution along the short arm region is not in the same proportion between the two chromosome 1 homologues. Moreover, the segmental mosaic UPD also differs between buccal mucosa and blood, and increasing levels of PUPD are distributed in at least 5 segments along the whole 1p in both tissues. These patterns are consistent with mosaic segmental uniparental disomy (UPD) occurring in 5 overlapping chromosome 1p regions in both buccal mucosa (fig 2B) and blood (fig 2A). Quantitative estimates of the variation in B allele frequency between tissues and segments is provided in Table 1.

FISH analysis of Patient metaphases revealed two red signals in both chromosomes 1q, but only a single green signal from the 1p36 region consistent with a sub-telomere deletion in one of the chromosome 1 homologues. Additionally, this pattern was observed in interphase nuclei as well (Fig. 2A). However, although not detected by array log Ratio analysis, two green signals were observed in 6/100 metaphase blood spreads (6% of cells) (Fig. 2B).

Using a telomere repeat probe, FISH revealed telomere signals on both short arms of chromosome 1 (Fig. 2C).

FISH in materials from the parents revealed a normal pattern, i.e., one green and one red signals on each chromosome 1, indicating that the deletion found in the Patient was *de novo*.

DISCUSSION

Terminal chromosomal rearrangements, including deletions, are one of the most commonly observed structural chromosome abnormalities and are often associated with intellectual disability and multiple congenital anomalies (15). Although terminal deletions have been described for every human chromosome, the molecular mechanism(s) that generate and stabilize terminal deletions are not completely understood.

In this article, we describe a *de novo* pter deletion of chromosome 1 combined with a complex, segmental, uniparental mosaicism distributed over blood and buccal mucosa, the only two tissues available to us. Earlier studies suggested that telomere capture was the most probable mechanism for stabilizing terminal deletions (16), although telomere capture often results in a balanced chromosome, which may not be detected. However, recent papers propose that the stabilization of terminal deletions most frequently occurred by addition of telomeric sequences directly onto broken ends, i.e., by chromosome healing (12,17).

The first intriguing finding in our case was the presence of cells in blood presenting two apparently normal chromosomes 1 in 6% of metaphases with FISH analysis, although there was no evidence of heterozygosity in the presumptive deleted region from the SNP array data (6% would have been easily detectable). This suggests that these cells had probably been rescued by the forming of neo-telomeres by telomerase.

The other, even more intriguing result, was the split pattern seen in the heterozygosity data of the SNP arrays (Figs. 2A and 2B), showing different proportions of B allele frequency across segments of the short arms of the two chromosome 1 homologues; this split increases from the expected 50% as it goes from the centromere to the 1p36 breakpoint. This indicates that telomere rescue in this patient occurred multiple times rather than once, which has not been described previously.

Based on our findings, we hypothesize a possible causal mechanism for explaining the relationship between an initial telomere deletion of 1p, and the derivation of segmental UPD giving rise to a complex mosaicism comprised of 6 cell lines present in both blood and buccal mucosa (Fig. 3).

We are unable to state whether the initial deletion occurred in a parental gamete or in a first embryonic cell division, once the complete lack of heterozygosity in the 1p36 region indicates absence of a second normal homologue. However, the presence of the same pattern of complex mosaicism distributed over two tissues demonstrates that the multiple captures must have occurred prior to the independent development of blood and buccal mucosa. The differences in B allele frequency between blood and buccal mucosa, with a generally higher level in buccal mucosa than blood, simply reflect the generally higher level of mosaicism in buccal mucosa than blood in this patient. It is possible that further mosaic lines are also present, but at too low level to be detected by current microarray analysis.

Recently, Martin and colleagues (2016) analyzed a case of a mosaic deletion of 20pter-p13 by SNP array and suggested a mitotic recombination rescue mechanism leading to one population of cells with a 20p deletion and a further population with normal copy number state, but regions of homozygosity in the 20pter-p13 deleted segment (20). None of these cases suggest that telomere capture could have occurred more than once in the same individual, either because recurrent telomere capture is a rare event or because, in the absence of allele frequency data, it may not be distinguished from a single telomere capture.

The use of genome-wide SNP arrays permits the simultaneous evaluation of copy number to detect allelic imbalances, genotypes, mosaicism, chimerism, regions of homozygosity including partial UPD (21–23)

The question of stabilization of 94% of the cells remains. Accordingly, we performed FISH with telomeric repeat probes and observed that even the 1p36 deleted chromosomes detected by absence of the sub-telomeric signal showed telomeric signals at both ends (Fig. 2C). Probably, these cells had become stabilized through creation of a neo-telomere on the deleted portion.

Although we have no independent method to relate how variations in BAF in our patient can be directly related to level of mosaicism for a given line, variations in BAF between patients with different levels of mosaicism in the classic study of Conlin et al., 2010, suggests that the F segment in buccal mucosa has a frequency of approximately 15%, decreasing up to ~5% in segment B.

To conclude, although in our case, telomere capture was a mechanism responsible for the stabilization of the deletion, the repetitive nature of the capture resulted in transfer of segments of different length from the normal 1p to the deleted 1p; this, together with a cell population stabilized by telomere healing, gave rise to a complex but similar admixture of UPD of 1p in the two tissues studied.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient and his parents for their cooperation. This work was supported by a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (130185/2014-0) and a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2012/50981-5).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare to have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, et al. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep;61(3):642–50.
2. Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet.* 2003 Oct;64(4):310–6.
3. Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG. Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007 Nov 15;145C(4):346–56.
4. Shimada S, Maegaki Y, Osawa M, Yamamoto T. Mild developmental delay and obesity in two patients with mosaic 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2014 Feb;164A(2):415–20.
5. Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, et al. Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003 May;72(5):1200–12.
6. Lustig AJ. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet.* 2003 Nov;4(11):916–23.
7. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):611–22.
8. Yu S, Graf WD. Telomere capture as a frequent mechanism for stabilization of the terminal chromosomal deletion associated with inverted duplication. *Cytogenet Genome Res.* 2010;129(4):265–74.
9. Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanella R, et al. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet.* 1994 Sep;55(3):505–12.
10. Chabchoub E, Rodríguez L, Galán E, Mansilla E, Martínez-Fernandez ML, Martínez-Frías ML, et al. Molecular characterisation of a mosaicism with a complex chromosome rearrangement: evidence for coincident chromosome healing by telomere capture and neo-telomere formation. *J Med Genet.* 2007 Apr;44(4):250–6.
11. Zuffardi O, Bonaglia M, Ciccone R, Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements?? *Clin Genet.* 2009 Jun;75(6):505–13.

12. Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, De Agostini C, Novara F, Fichera M, et al. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002173.
13. Knijnenburg J, van Haeringen A, Hansson KBM, Lankester A, Smit MJM, Belfroid RDM, et al. Ring chromosome formation as a novel escape mechanism in patients with inverted duplication and terminal deletion. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2007 May;15(5):548–55.
14. Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG. Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 1;12(17):2153–65.
15. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, et al. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A.* 2007 Aug 15;143A(16):1850–7.
16. Slijepcevic P, Bryant PE. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. *Int J Radiat Biol.* 1998 Jan;73(1):1–13.
17. Fortin F, Beaulieu Bergeron M, Fetni R, Lemieux N. Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in 40 cases of constitutional abnormalities. *Cytogenet Genome Res.* 2009;125(3):176–85.
18. Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, Bigoni S, Sensi A, Baroncini A, et al. Mosaic 22q13 deletions: evidence for concurrent mosaic segmental isodisomy and gene conversion. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2009 Apr;17(4):426–33.
19. Ballif BC, Wakui K, Gajecka M, Shaffer LG. Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet.* 2004 Jan;114(2):198–206.
20. Martin MM, Vanzo RJ, Sdano MR, Baxter AL, South ST. Mosaic deletion of 20pter due to rescue by somatic recombination. *Am J Med Genet A.* 2016 Jan;170A(1):243–8.
21. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 1;19(7):1263–75.
22. Jinawath N, Zambrano R, Wohler E, Palmquist MK, Hoover-Fong J, Hamosh A, et al. Mosaic trisomy 13: understanding origin using SNP array. *J Med Genet.* 2011 May;48(5):323–6.
23. Shin SY, Yoo H-W, Lee BH, Kim KS, Seo E-J. Identification of the mechanism underlying a human chimera by SNP array analysis. *Am J Med Genet A.* 2012 Sep;158A(9):2119–23.

Figure 1. SNP array analysis for chromosome 1 showing Log R ratio in the top panel and B allele frequency (BAF) in the bottom panel. A) SNP array shows the deletion of 4MB in 1p36.33p36.32 (82,154-4,111,187) and the split from the subtelomeric 1p36 converging to the pericentromeric 1p12 region. B) A closer view for the chromosome region 1p36.2p36.1, showing the deletion of 1p36 and four genotypes found. BAF revealed a very complex genotypes of short arm of chromosome 1 and suggest a complex inheritance pattern. This pattern probably results from a graded reduction of uniparental mosaicism and suggests uniparental disomy. But the UPD is located just at the short arm chromosome 1.

Fig. 2 Microarray variation of B allele frequency across regions in chromosome 1 suspected to be involved in segmental uniparental disomy in Buccal mucosa (2A) and Blood (2B)

2A Buccal mucosa

2B Blood

Table 1 Variation in B allele frequency across segments of chromosome 1p and proximal 1q

Preamble: As shown in figs 2A and 2B chromosome 1 was divided into 6 regions with region A comprising 1q and regions B, C, D, E, and F sections of chromosome 1p. The Y coordinates corresponding to the frequency of the ABB genotypes above and the AAB genotypes below were measured using the mouse pointer on a full screen image of Figs 2A and 2B in Preview for Mac OS enabled by key stroke combination (CMD – Shift – 4). The B allele values for each segment were normalized using the fixed B allele frequency scale to remove differences in magnification between images 2A and 2B. To further reduce the affect of measurement errors, it was assumed that the B allele frequencies above and below 0.50 for any given chromosome position would be of the same magnitude; accordingly the value apportioned to the lines above and below 0.50 for each segment was the total distance between the two lines divided by two.

		Segments					
Tissue	Genotypes	F	E	D	C	B	A
Blood	ABB	56.42	55.57	55.03	54.06	53.75	53.69
	AAB	43.76	44.42	44.96	45.96	46.24	46.31
Buccal Mucosa	ABB	60.34	59.02	57.93	55.8	54.65	53.04
	AAB	39.65	40.97	42.06	44.2	45.34	46.95

Visual comparison of Figs 2A and 2B shows that both tissues exhibit 6 levels of UPD mosaicism with segment A representing the normal non-mosaic genotype. We first thought that the difference. Although we first thought that the main difference between buccal mucosa and blood

Figure 2: FISH analysis for peripheral blood from the proband using subtelomeric probes for 1p36 (RP11-465B22: green signal), 1q44 (CTB-160H23: red signal). A. FISH showing a metaphase presenting deletion for 1p subtelomeric probe (RP11-465B22) with no other cytogenetic rearrangement detected. B. FISH showing a metaphase presenting no imbalance for the chromosome 1 (two red and two green signals are shown).

C. FISH in human metaphase chromosomes for the Patient using the $(TTAGGG)_n$ sequence (green signal) detected telomeric repeats in both terminals of chromosome 1 (arrows)

Figure 3. A model for the origin of a complex segmental mosaic of uniparental disomy for chromosome region 1p.

A population of 1p36 deleted cells originated from either a gamete or an early zygote contained an initial 1p36 terminal deletion. Each of those 1p36 terminally deleted cells would normally stop dividing and die unless the missing telomere was reinstated by either telomere capture, the main process described here, or telomere healing by telomerase. Recurrent telomere recapture by recombination between the deleted chromosome 1 and the normal chromosome 1 homologue in the early zygote produced populations of cells with intact 1p telomeres but with varying lengths of uniparental disomy dependent upon the position of recombination between the deleted chromosome 1 and various locations within the short arm of the normal 1.

ARTIGO 2**Trisomy and tetrasomy of chromosome 15q11q13 identified by SNP array
in three idiopathic intellectual disability patients**

Alexsandro dos Santos¹, Francine Campagnari¹, Maria de Lourdes Ribeiro
Câmara², Rita de Cássia E. de Arruda Brasil², Ligia Vieira¹, Carla Rosenberg^{1,*}

1 - Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Bioscience,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

2 - Center of Odontological Assistance to patients with special needs, Faculty of
Odontology, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Carla Rosenberg
Department of Genetics and Evolutionary Biology
Institute of Biosciences
University of São Paulo
Rua do Matão, 277
São Paulo, Brazil
Telephone: (11) 30917573
email: carlarosenberg@uol.com.br

INTRODUCTION

The genomic instability of proximal chromosome 15 is mediated by low-copy repeats, resulting in five recurrent breakpoints (BP) (Pujana et al. 2002; Depienne et al. 2009), involved in deletions associated either with Angelman syndrome (AS) or with Prader-Willi syndrome (PWS), duplications, triplications, translocations, inversions and supernumerary marker chromosomes (SMC) (Browne et al. 1997; Wang et al. 2004; Battaglia 2008; Al Ageeli et al. 2014; Castronovo et al. 2015)

Cytogenetically visible duplications (OMIM #608636) of this region have been reported, and lead to a disorder named 15q duplication syndrome, mostly manifested by neurobehavioral phenotypes. These duplications occur mostly in two forms, including an extra isodicentric 15 (idic(15)) chromosome or an interstitial duplication 15 (Battaglia et al. 2010; Szabo et al. 2015). The psu dic(15) arises in two additional maternally derived copies on a supernumerary chromosome, most commonly leading to four copies of the region and the interstitial 15q duplication, in which one extra copy of the 15q11.2q13.1 region occurs on the same chromosome arm, typically results in three copies of the region (DiStefano et al. 2016). As stated in a previous paper, idic(15) or inv dup(15) is more accurately referred to as pseudodicentric chromosomes 15 [psu dic(15;15)] (Wandstrat and Schwartz 2000).

Trisomy and tetrasomy of the 15q11q13 region has been previously described in patients with intellectual disability (ID), developmental delay, autism spectrum disorders, epilepsy, schizophrenia, abnormal social behavior, language and cognitive impairment (Maraschio et al. 1981; Schinzel et al. 1994; Silva et al. 2002; Wang et al. 2004; Michelson et al. 2011; Bouhjar et al. 2012; Christofolini et al. 2012; Al Ageeli et al. 2014; Tan et al. 2014; Castronovo et al. 2015; Szabo et al. 2015). However, complex chromosomal rearrangements (CCR), such as tetrasomy-triplication, associated with SCM are less frequent.

Developments in chromosomal array technology allow whole-genome analysis for copy number variants (CNVs) at a resolution 10–10,000 times

higher than that of conventional karyotyping (Gijsbers et al. 2009). Additionally, fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or high resolution chromosomal microarray studies have identified cryptic CCRs as a cause of abnormal phenotype in a significant number of patients with intellectual disability/developmental delay (Christofolini et al. 2012; Hemmat et al. 2014). Particularly, SNP array analysis is robust in accurately identifying and determining the breakpoints of the 15q11q13 region and, therefore, this technology could be extended to analyze a large cohort of children with neurodevelopmental disorders (Baron et al. 2006).

In this report, the authors show three cases of unrelated ID patients **trisomy and tetrasomy of chromosome 15q11q13** characterized by SNP array and FISH experiments.

PATIENTS

Case 1

The patient, an 13-year-old female, was the second child born to nonconsanguineous healthy parents. The mother and father were, respectively, 42 and 45 years old. Pregnancy and delivery at term were with no complication. The Patient walked at 27 months. She was never able to speak, has seizures since at the age 10 and presents ID. There is no family history of autism, ID, or other neurologic impairments. She takes depakote and aristab.

Case 2

Twelve-year-old female Patient, child of nonconsanguineous healthy parents. The mother and father were, respectively, 52 and 43 years old. Mother reported a nephew presenting seizures and ID. During gestation, mother presented hypertension. The patient was born at term, by caesarean section. After that, she was in an incubator for 1 night. She sitted and walked at eight and 17 months, respectively. Regarding neurodevelopment, Patient presents

speech and walking difficulties, attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and ID. She takes risperidone.

Case 3

Ten-year-old female Patient, second child of nonconsanguineous healthy parents. The mother and father were, respectively, 42 and 50 years old. Born at term, by normal delivery, after an uneventful pregnancy. She walked independently at 20 months and has problems of socialization, ADHD, ID and processing language and speaking. The Patient has hypertelorism and low ear implantation. She takes ritalin and risperidone.

METHODS

Saliva and blood from patients were collected for cytogenetic and molecular experiments.

Genome wide SNP array analysis

DNA from saliva was extracted using phenol-chloroform standard laboratory protocol. Patients DNA samples were hybridized to a CytoSNP 850K BeadChip (Illumina, USA) according to the supplier's instructions. This beadchip contains 850,000 SNP single nucleotide polymorphisms (SNPs) probes spanning across the whole genome. Data were analyzed using BlueFuse Multi 4.0 Software (BlueGnome Ltd. Cambridge, UK), and log R Ratio and B Allele Frequency (BAF) values were plotted along chromosomal coordinates. The program calls regions with copy number or allele frequency alterations, which were then manually curated.

Fluorescence in situ hybridization

Metaphases were obtained through 72h PHA stimulated peripheral blood lymphocyte cultures according to standard protocols. Fluorescence *in situ*

hybridization (FISH) was performed using RP11 142M24 (mapped to chromosome 15q12) and alpha satellite probes (specific for the centromeric region of chromosomes 15). Both probes are part of a 1 MB BAC/PAC set donated by Dr. Nigel Carter (Sanger Center, Wellcome Trust) and can be visualized in the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>). Briefly, cells are harvested, lysed, and the BAC DNA was purified from the bacterial host and used for probe synthesis. Biotin or digoxigenin-labeled probes were generated using a nick translation labeling mix (Biotin/DIG Nick Translation Mix, Roche, Germany) according to the manufacturer's procedures. Immunodetection was performed using both sheep-anti-digoxigenin-Rhodamine (red) and avidin fluorescein (green) (Roche, Germany).

RESULTS

For the Patient 1, SNP array detected a gain in copy number of the long arm of chromosome 15 in 15q11.2q13.1. Additionally, the BAF pattern shows a quadruplication spanning approximately 6 Mb in that region: arr 15q11.2q13.1(22,576,118-28,544,359)x3 (Fig. 1A). This alteration lies between BP1 and BP3 (Figure 1D). The gain of copy number was verified by FISH (Fig. 2A). Additionally, FISH experiment showed a supernumerary marker chromosome (SMC), of dicentric nature, derived from chromosome 15 easily identified with specific probes for the centromeric region of chromosome 15 (Fig). The karyotype of Patient was interpreted as 47,XX,psu dic(15;15).

For the Patient 2, SNP array detected a gain in copy number of the long arm of chromosome 15, spanning approximately 7.9 Mb from 15q11.2 to 15q13.3 (Figure 1B). This gain of copy number lies between BP1 and BP5 (Figure 1D). The BAF allele pattern revealed a quadruplication of 6.7 Mb from arr 15q11.2q13.2 (23,656,946-30,361,587)x3 followed by a triplication of 0.6 Mb from arr 15q13.2q13.3 (30,936,285-31,557,581)x3 (Fig. 1B). The FISH experiment showed the presence of an aberrant 15 chromosome, with the additional chromosomal material on q arm in just one homologue (Fig. 2B).

Moreover, the duplications lie supposedly adjacent to each other, i. e., are in *tandem*. The karyotype of Patient found was 46,XX,dup(15).

For the Patient 3, SNP array detected a gain in copy number of the long arm of chromosome 15, spanning approximately 9.7 Mb from 15q11.2 to 15q13.3 (figure 1C), and this alteration lies between BP1 and BP5 (Figure 1D). The BAF allele pattern revealed a quadruplication of 7,6 Mb from arr 15q11.2q13.2 (22,750,305-30,371,774)x3 followed by a triplication of 1.6 Mb from arr 15q13.2q13.3 (30,936,285-32,514,341)x3 (Fig 1C). As found on Patient 1, The FISH experiment revealed a SMC derived from chromosome 15 as well (Fig 2C). Karyotype of Patient was interpreted as 47,XX,psu dic(15;15).

According to DECIPHER, the CNVs found on all three patients overlap with the region of chromosome 15q11q13 duplication syndrome (OMIM#608636).

DISCUSSION

The chromosome 15q11q13 duplication syndrome clinical findings include developmental delay, intellectual disability, early central hypotonia, seizures, absent or poor language (e.g., marked echolalia), and autism behaviour (Bundey et al. 1994; Browne et al. 1997; Battaglia 2008; Battaglia et al. 2010). Additionally, minor facial dysmorphisms, such as down-slanting palpebral fissures, epicanthal folds, deep-set eyes, low-set ears, and highly arched palate, have been described (Kim et al. 2012).

There is a remarkable diversity in the severity of symptoms in patients presenting chromosome 15q11q13 duplication syndrome, even in individuals with exactly the same genotype (Kalsner and Chamberlain 2015). Various genetic mechanisms have been hypothesized to explain patients clinical heterogeneity, including the size or localization (whether they are interstitial or supernumerary) of chromosomal duplication, dosage effect of genes in 15q11q13 region, and the imprinting mechanism (Battaglia 2008).

The clinical aspects found on our Patients are in agreement with other studies (Ouldim et al. 2007; Battaglia 2008; Battaglia et al. 2010). Although seizure was reported just for the Patient 1, the prevalence estimates of seizures varies from 26.5 to 50% in chromosome 15q11q13 duplication syndrome (Conant et al. 2014), being more common in children with psu dic(15) (63%) than in those with interstitial duplications (13%) (Conant et al. 2014; Kalsner and Chamberlain 2015). Furthermore, seizures may be one of the principal symptoms that require therapeutic interventions from early infancy, and provide a diagnostic clue (Kim et al. 2012).

Speech delay is reported in the majority of individuals (Barnett and van Bon 2015) and they display cognitive impairments in the areas of comprehension and expressive language as well (Gordillo-González et al. 2013). Regarding our patients, speaking in all of them is absent or very poor.

Age of acquisition of motor milestones are rarely reported in the medical literature. Nevertheless, it seems that sitting is achieved between 10-20 months of age, and walking between 24-36 months (Battaglia 2008). In our study, Patients 1, 2 and 3 walked at 27, 17 and 20 months, respectively. Additionally, Patient 2 still has problems for walking. Gross and fine motor skills delays are very common, and, eventhough hypotonia was not reported in our Patients, it can contribute to this delay in other cases (Kalsner and Chamberlain 2015).

Human genomic rearrangements with two or more breakpoint junctions are referred to as complex chromosomal rearrangements (CCRs) (Zhang et al., 2009a). In our study, the SNP array revealed two cases (Patients 2 and 3) presenting a CCR, with a quadruplication followed by a triplication. Different from those cases, our Patient 1 presented just one region with quadruplication. Furthermore, it was really interesting to point that both rearrangements found on Patients 1 and 3 were associated with the presence of SMC. The only case with no SMC was Patient 2.

It has long been suggested that psu dic chromosomes are derived from a “U-type” exchange (Ungaro et al. 2001; Vialard et al. 2003; McDermid and Wevrick 2006). Mediated by low copy repeats (LCRs), presenting in recurrent

breakpoints (BPs), a U-type exchange between repeats in opposite orientation would lead to a dicentric SMC as well as an acentric fragment composed of two copies of the rest of each chromatid. The acentric fragment would be lost, whereas the SMC would be retained through nondisjunction and inactivation of one centromere (McDermid and Wevrick 2006). If a U-type exchange occurs between elements of the same LCR (allelic), the resulting psu dic chromosome would essentially be symmetrical. A U-type exchange between similar elements of different LCRs (nonallelic) would produce an asymmetric SMC. Asymmetric inv dup SMCs could also result from a paracentric inversion of a region between LCRs, followed by recombination within the inversion loop. This would similarly result in a dicentric SMC and an acentric fragment that is lost (Emanuel and Shaikh 2001; McDermid and Wevrick 2006). Moreover, U-type exchange mechanism can occur in three chromatides or two different chromosomes (Ungaro et al. 2001; Vialard et al. 2003).

A probable mechanism responsible for the tetrasomy associated with SMC found on Patient 1 can be U-type exchange between two homologue chromosomes 15. The same mechanism possibly occurred in Patient 3, however, the U-type exchange between two homologues chromosomes should be unequal - considering that the SNP array revealed a quadruplication followed by a triplication on 15q11.2q13.3 region and FISH confirmed the presence of a SMC.

For the Patient 2, presenting a quadruplication followed a triplication with no SMC, there are a few mechanisms responsible for that. Schinzel et al. (1994) proposed that the first step to arise a triplicated (tetrasomic) region involves an unstable dicentric psu dic(15) chromosome of maternal origin containing a direct and an inverted repeat. If the second centromere was not inactivated immediately after formation, a broken chromosome would result at the subsequent cell division. Triplication would be the result of recombination between this broken chromosome and the remaining normal chromosome 15 followed by the loss of the supernumerary marker (Schinzel et al. 1994). One intrachromosomal triplicated (tetrasomic) region with an inverted middle repeat may also arise from mechanisms involving U-type exchanges among three

chromatids (Wang et al. 1999). This mechanism may involve homologous and sister chromatids or homologous chromatids only. U-type exchanges involving only homologous chromatids could form a dicentric chromosome as an intermediate (Wang et al. 1999). For the Patient 2, FISH experiments (Fig. 2B) revealed that one of homologue chromosome 15 has intensity of probe signal around 3x greater than another homologue, and with no SMC. Whereas 15p tetrasomy is most commonly observed as a SMC, it is possible that the triplicated chromosome seen in our patient arose from fusion of a marker chromosome, therefore the hypothesis of Schinzel et al. (1994) or Wang et al. (1999) should take into consideration.

So far, besides the quadruplication associated with SMC in one Patient and a quadruplication-triplication with no karyotype alteration in another Patient, this paper shows the first report of one Patient presenting a complex rearrangement (quadruplication followed by triplication) of chromosome 15 with the presence of SMC, analyzed by SNP array and FISH. The SNP array was extremely important to elucidate the mechanism of this rearrangement determining the BPs and FISH experiments were responsible to clarify the nature of this alteration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient and their parents for their cooperation. This work was supported by a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (130185/2014-0) and a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2012/50981-5).

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- Al Ageeli E, Drunat S, Delanoë C, Perrin L, Baumann C, Capri Y, et al. Duplication of the 15q11-q13 region: clinical and genetic study of 30 new cases. *Eur J Med Genet*. 2014 Jan;57(1):5–14.
- Barnett CP, van Bon BWM. Monogenic and chromosomal causes of isolated speech and language impairment. *J Med Genet*. 2015 Nov;52(11):719–29.
- Baron CA, Tepper CG, Liu SY, Davis RR, Wang NJ, Schanen NC, et al. Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin-proteasome pathway processes. *Hum Mol Genet*. 2006 Mar 15;15(6):853–69.
- Battaglia A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Nov 19;3:30.
- Battaglia A, Parrini B, Tancredi R. The behavioral phenotype of the idic(15) syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010 Nov 15;154C(4):448–55.
- Beck CR, Carvalho CMB, Baner L, Gambin T, Stubbolo D, Yuan B, et al. Complex genomic rearrangements at the PLP1 locus include triplication and quadruplication. *PLoS Genet*. 2015 Mar;11(3):e1005050.
- Bouhjar IBA, Gmidène A, Soyah N, Hanene H, Mougou S, Elghezal H, et al. Trisomy and tetrasomy 15q11-q13 diagnosed by molecular cytogenetic analysis in two patients with mental retardation. *J Pediatr Genet*. 2012 Mar;1(1):63–8.
- Browne CE, Dennis NR, Maher E, Long FL, Nicholson JC, Sillibourne J, et al. Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 1997 Dec;61(6):1342–52.
- Bundey S, Hardy C, Vickers S, Kilpatrick MW, Corbett JA. Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. *Dev Med Child Neurol*. 1994 Aug;36(8):736–42.
- Castronovo C, Crippa M, Bestetti I, Rusconi D, Russo S, Larizza L, et al. Complex de novo chromosomal rearrangement at 15q11-q13 involving an intrachromosomal triplication in a patient with a severe neuropsychological phenotype: clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2015 Jan;167A(1):221–30.
- Christofolini DM, Meloni VA, Ramos MA de P, Oliveira MM, de Mello CB, Pellegrino R, et al. Autistic disorder phenotype associated to a complex 15q intrachromosomal rearrangement. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2012 Oct;159B(7):823–8.
- Conant KD, Finucane B, Cleary N, Martin A, Muss C, Delany M, et al. A survey of seizures and current treatments in 15q duplication syndrome. *Epilepsia*. 2014 Mar;55(3):396–402.
- Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, et al. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2009 Aug 15;66(4):349–59.
- DiStefano C, Gulsrud A, Huberty S, Kasari C, Cook E, Reiter LT, et al. Identification of a distinct developmental and behavioral profile in children with Dup15q syndrome. *J Neurodev Disord*. 2016;8:19.

Emanuel BS, Shaikh TH. Segmental duplications: an “expanding” role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet*. 2001 Oct;2(10):791–800.

Gijsbers ACJ, Lew JYK, Bosch CAJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, den Hollander NS, et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2009 Nov;17(11):1394–402.

Gordillo-González G, Hernández MP, Tamayo ML, Osorio G. A patient with convulsive syndrome and partial tetrasomy of chromosome 15. *Neurol Barc Spain*. 2013 Apr;28(3):191–3.

Hemmat M, Yang X, Chan P, McGough RA, Ross L, Mahon LW, et al. Characterization of a complex chromosomal rearrangement using chromosome, FISH, and microarray assays in a girl with multiple congenital abnormalities and developmental delay. *Mol Cytogenet*. 2014;7:50.

Kalsner L, Chamberlain SJ. Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 Duplication Syndromes. *Pediatr Clin North Am*. 2015 Jun;62(3):587–606.

Kim JS, Park J, Min B-J, Oh SK, Choi JS, Woo MJ, et al. A case of isodicentric chromosome 15 presented with epilepsy and developmental delay. *Korean J Pediatr*. 2012 Dec;55(12):487–90.

Lee JA, Carvalho CMB, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*. 2007 Dec 28;131(7):1235–47.

Liu P, Erez A, Nagamani SCS, Dhar SU, Kołodziejska KE, Dharmadhikari AV, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):889–903.

Maraschio P, Zuffardi O, Bernardi F, Bozzola M, De Paoli C, Fonatsch C, et al. Preferential maternal derivation in inv dup(15): analysis of eight new cases. *Hum Genet*. 1981;57(4):345–50.

McDermid HE, Wevrick R. inv dup(15) and inv dup(22). In: MD JRL, MD PS, editors. *Genomic Disorders* [Internet]. Humana Press; 2006 [cited 2017 Mar 2]. p. 315–25. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-039-3_22

Michelson M, Eden A, Vinkler C, Leshinsky-Silver E, Kremer U, Lerman-Sagie T, et al. Familial partial trisomy 15q11-13 presenting as intractable epilepsy in the child and schizophrenia in the mother. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2011 May;15(3):230–3.

Ouldim K, Natiq A, Jonveaux P, Sefiani A. Tetrasomy 15q11-q13 Diagnosed by FISH in a Patient with Autistic Disorder. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Mar 2];2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1874673/>

Pujana MA, Nadal M, Guitart M, Armengol L, Gratacòs M, Estivill X. Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2002 Jan;10(1):26–35.

Schinzel AA, Brecevic L, Bernasconi F, Binkert F, Berthet F, Wuilloud A, et al. Intrachromosomal triplication of 15q11-q13. *J Med Genet*. 1994 Oct;31(10):798–803.

Silva AE, Vayego-Lourenco SA, Fett-Conte AC, Goloni-Bertollo EM, Varella-Garcia M. Tetrasomy 15q11-q13 identified by fluorescence in situ hybridization in a patient with autistic disorder. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002 Jun;60(2–A):290–4.

Szabo A, Czako M, Hadzsiev K, Duga B, Komlosi K, Melegh B. Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype. *Mol Cytogenet.* 2015;8:41.

Tan E-S, Yong M-H, Lim EC, Li Z-H, Brett MS, Tan E-C. Chromosome 15q11-q13 copy number gain detected by array-CGH in two cases with a maternal methylation pattern. *Mol Cytogenet.* 2014;7:32.

Ungaro P, Christian S, Fantes J, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, et al. Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet.* 2001 Jan;38(1):26–34.

Vialard F, Mignon-Ravix C, Parain D, Depetris D, Portnoï M-F, Moïrot H, et al. Mechanism of intrachromosomal triplications 15q11-q13: a new clinical report. *Am J Med Genet A.* 2003 Apr 30;118A(3):229–34.

Wandstrat AE, Schwartz S. Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma.* 2000 Nov;109(7):498–505.

Wang J, Reddy KS, Wang E, Halderman L, Morgan BL, Lachman RS, et al. Intrachromosomal triplication of 2q11.2-q21 in a severely malformed infant: case report and review of triplications and their possible mechanism. *Am J Med Genet.* 1999 Feb 12;82(4):312–7.

Wang NJ, Liu D, Parokonny AS, Schanen NC. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):267–81.

Figure 1. SNP array results of a part of chromosome 15 long arm showing Log R ratio (top panel) and B allele frequency (BAF) (bottom panel) for the Patients 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Grey and blue bars bellow BAF plots show a region with 4 and 3 copies, respectively. (A) SNP array for the patient 1 showing a gain in copy number spanning 6 Mb from 15q11.2 to 15q13.1. (B) SNP array for the patient 2 showing a gain in copy number spanning 7.9 Mb from 15q11.2 to 15q13.3. The region from 15q11.2 to 15q13.2 (6.7 Mb sized) followed by the region from 15q13.2 to 15q13.3 (0,6 Mb sized) present four and three copies, respectively. (C) SNP array for the Patient 3 showing a gain in copy number spanning 9,7 Mb from 15q11.2 to 15q13.3. The region from 15q11.2to 15q13.2 (7,6 Mb sized) presents four copies. The following region spanning 1,6 Mb from 15q13.2 to 15q13.3 presents three copies. (D) Schematic representation of the 15q11.2q14 region and the breakpoint cluster (BP) from BP1 to BP5 (red rectangles).

Figure 2. FISH results using RP11 142M24 (mapped inside of 15q12 region) and alpha satellite probes (specific for the centromeric region of chromosomes 15) for the Patients 1, 2 and 3. (A) FISH for the Patient 1 using RP11 142M24 (green signal) and alpha satellite (red signal) probes. The analysis showed four red and four green signals: two red and two signals for the normal chromosomes 15 (white arrows) and two red and two green signals for the small supernumerary marker chromosome (SMC) (yellow arrow). The karyotype was 47,XX,psu dic(15;15). (B) (A) FISH for the Patient 2 using RP11 142M24 probe (red signal) showing that one of homologue chromosomes has signal intensity around 3x greater than another one. (C) FISH for the Patient 3 using RP11 142M24 (green signal) and alpha satellite (red signal) probes. As for the Patient 1, the analysis showed a four red and four green signals: two red and two signals for the normal chromosomes 15 (white arrows) and two red and two green signals for the SMC (yellow arrow). Patient's karyotype was interpreted as 47,XX,psu dic(15;15).

Figure 1

Figure 2

V. CONCLUSÕES

1. Verificamos que o SNP *array* como primeira linha de investigação resultou em taxa alta de diagnóstico, embora outros fatores também devam ter contribuído para a alta porcentagem obtida.

2. A maior parte das alterações detectadas na nossa coorte poderia ter sido detectada por técnicas de citogenética convencionais.

3. SNP *array* é uma ferramenta poderosa para elucidar a estrutura de alterações complexas e composição de amostras em mosaico.

REFERÊNCIAS

- 1000 Genomes Project Consortium, Adam Auton, Lisa D. Brooks, Richard M. Durbin, Erik P. Garrison, Hyun Min Kang, Jan O. Korb, et al. «A Global Reference for Human Genetic Variation». *Nature* 526, n. 7571 (1 de Outubro de 2015): 68–74. doi:10.1038/nature15393.
- Alaimo, Joseph T., Laura V. Barton, Sureni V. Mullegama, Rachel D. Wills, Rebecca H. Foster, e Sarah H. Elsea. «Individuals with Smith-Magenis Syndrome Display Profound Neurodevelopmental Behavioral Deficiencies and Exhibit Food-Related Behaviors Equivalent to Prader-Willi Syndrome». *Research in Developmental Disabilities* 47 (Dezembro de 2015): 27–38. doi:10.1016/j.ridd.2015.08.011.
- Albertson, Donna G., e Daniel Pinkel. «Genomic Microarrays in Human Genetic Disease and Cancer». *Human Molecular Genetics* 12 Spec No 2 (15 de Outubro de 2003): R145–152. doi:10.1093/hmg/ddg261.
- Alkan, Can, Bradley P. Coe, e Evan E. Eichler. «Genome Structural Variation Discovery and Genotyping». *Nature Reviews. Genetics* 12, n. 5 (Maio de 2011): 363–76. doi:10.1038/nrg2958.
- Alkuraya, Fowzan S. «Homozygosity Mapping: One More Tool in the Clinical Geneticist's Toolbox». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12, n.º 4 (abril de 2010): 236–39. doi:10.1097/GIM.0b013e3181ceb95d.
- American Association on Intellectual and Developmental Disabilities. «Intellectual Disability». Acessado 22 de março de 2017. <https://aaidd.org/intellectual-disability#.WNLBgjvyvIU>.
- Anazi, S., S. Maddirevula, E. Faghih, H. Alsedairy, F. Alzahrani, H. E. Shamseldin, N. Patel, et al. «Clinical Genomics Expands the Morbid Genome of Intellectual Disability and Offers a High Diagnostic Yield». *Molecular Psychiatry*, 19 de Julho de 2016. doi:10.1038/mp.2016.113.
- Asadollahi, Reza, Beatrice Oneda, Pascal Joset, Silvia Azzarello-Burri, Deborah Bartholdi, Katharina Steindl, Marie Vincent, et al. «The Clinical Significance of Small Copy Number Variants in Neurodevelopmental Disorders». *Journal of Medical Genetics* 51, n. 10 (Outubro de 2014): 677–88. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102588.
- Babaji, Prashant, Anurag Singh, Himani Lau, G. Lamba, e P. Somasundaram. «Deletion of Short Arm of Chromosome 18, Del(18p) Syndrome». *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 32, n. 1 (Março de 2014): 68–70. doi:10.4103/0970-4388.127063.
- Barber, J. C. K., S. Zhang, N. Friend, A. L. Collins, V. K. Maloney, R. Hastings, B. Farren, et al. «Duplications of Proximal 16q Flanked by Heterochromatin Are Not Euchromatic Variants and Show No Evidence of Heterochromatic Position Effect». *Cytogenetic and Genome Research* 114, n. 3–4 (2006): 351–58. doi:10.1159/000094225.
- Baroncini, Anna, Francesca Rivieri, Antonella Capucci, Gianfranco Croci, Fabrizia Franchi, Alberto Sensi, Paola Battaglia, Vincenzo Aiello, e Elisa Calzolari. «FISH Screening for Subtelomeric Rearrangements in 219 Patients with Idiopathic Mental Retardation and Normal Karyotype». *European Journal of Medical Genetics* 48, n. 4 (Dezembro de 2005): 388–96. doi:10.1016/j.ejmg.2005.05.002.
- Bartnik, Magdalena, Barbara Wiśniowiecka-Kowalik, Beata Nowakowska, Marta Smyk, Marta Kędzior, Katarzyna Sobecka, Anna Kutkowska-Kaźmierczak, et al. «The Usefulness of Array Comparative Genomic Hybridization in Clinical Diagnostics of Intellectual Disability in Children». *Developmental Period Medicine* 18, n. 3 (Setembro de 2014): 307–17.
- Basel-Vanagaite, Lina. «Clinical Approaches to Genetic Mental Retardation». *The Israel Medical Association Journal: IMAJ* 10, n. 11 (Novembro de 2008): 821–26.
- Basel-Vanagaite, L. «Genetics of Autosomal Recessive Non-Syndromic Mental Retardation: Recent Advances». *Clinical Genetics* 72, n.º 3 (setembro de 2007): 167–74. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00881.x.

- Battaglia, Agatino, e John C. Carey. «Diagnostic Evaluation of Developmental Delay/mental Retardation: An Overview». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 117C, n. 1 (15 de Fevereiro de 2003): 3–14. doi:10.1002/ajmg.c.10015.
- Battaglia, Agatino, Viola Doccini, Laura Bernardini, Antonio Novelli, Sara Loddo, Anna Capalbo, Tiziana Filippi, e John C. Carey. «Confirmation of Chromosomal Microarray as a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Delay, Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorders and Dysmorphic Features». *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society* 17, n. 6 (Novembro de 2013): 589–99. doi:10.1016/j.ejpn.2013.04.010.
- Beaudet, Arthur L. «The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics». *Child Development* 84, n. 1 (Fevereiro de 2013): 121–32. doi:10.1111/cdev.12050.
- Besseau-Ayasse, J., C. Violle-Poirsier, A. Bazin, N. Gruchy, A. Moncla, F. Girard, M. Till, et al. «A French Collaborative Survey of 272 Fetuses with 22q11.2 Deletion: Ultrasound Findings, Fetal Autopsies and Pregnancy Outcomes». *Prenatal Diagnosis* 34, n. 5 (Maio de 2014): 424–30. doi:10.1002/pd.4321.
- Bhatia, Shipra, e Dirk A. Kleinjan. «Disruption of Long-Range Gene Regulation in Human Genetic Disease: A Kaleidoscope of General Principles, Diverse Mechanisms and Unique Phenotypic Consequences». *Human Genetics* 133, n. 7 (Julho de 2014): 815–45. doi:10.1007/s00439-014-1424-6.
- Biesecker, Leslie G., e Nancy B. Spinner. «A Genomic View of Mosaicism and Human Disease». *Nature Reviews. Genetics* 14, n.º 5 (maio de 2013): 307–20. doi:10.1038/nrg3424.
- Bishop, Ryan. «Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance». *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research* 3, n. 1 (1 de Março de 2010): 85–95. doi:10.1093/biohorizons/hzq009.
- Boggula, Vijay Raju, Meenal Agarwal, Rashmi Kumar, Shally Awasthi, e Shubha R. Phadke. «Recurrent Benign Copy Number Variants & Issues in Interpretation of Variants of Unknown Significance Identified by Cytogenetic Microarray in Indian Patients with Intellectual Disability». *The Indian Journal of Medical Research* 142, n. 6 (Dezembro de 2015): 699–712. doi:10.4103/0971-5916.174561.
- Botto, Lorenzo D., Kristin May, Paul M. Fernhoff, Adolfo Correa, Karlene Coleman, Sonja A. Rasmussen, Robert K. Merritt, et al. «A Population-Based Study of the 22q11.2 Deletion: Phenotype, Incidence, and Contribution to Major Birth Defects in the Population». *Pediatrics* 112, n. 1 Pt 1 (Julho de 2003): 101–7.
- Brisset, S., G. Joly, C. Ozilou, J.-M. Lapierre, Ph Gosset, M. LeLorc'h, O. Raoul, C. Turleau, M. Vekemans, e S. P. Romana. «Molecular Characterization of Partial Trisomy 16q24.1-Qter: Clinical Report and Review of the Literature». *American Journal of Medical Genetics* 113, n. 4 (15 de Dezembro de 2002): 339–45. doi:10.1002/ajmg.b.10740.
- Bulayeva, Kazima, Klaus-Peter Lesch, Oleg Bulayev, Christopher Walsh, Stephen Glatt, Farida Gurganova, Jamilja Omarova, Irina Berdichevets, e Paul M. Thompson. «Genomic Structural Variants Are Linked with Intellectual Disability». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 122, n. 9 (Setembro de 2015): 1289–1301. doi:10.1007/s00702-015-1366-8.
- Buyse, Karen, Barbara Delle Chiaie, Rudy Van Coster, Bart Loeys, Anne De Paepe, Geert Mortier, Frank Speleman, e Björn Menten. «Challenges for CNV Interpretation in Clinical Molecular Karyotyping: Lessons Learned from a 1001 Sample Experience». *European Journal of Medical Genetics* 52, n. 6 (Dezembro de 2009): 398–403. doi:10.1016/j.ejmg.2009.09.002.
- Carmona-Mora, Paulina, Carolina A. Encina, Cesar P. Canales, Lei Cao, Jessica Molina, Pamela Kairath, Juan I. Young, e Katherina Walz. «Functional and Cellular

- Characterization of Human Retinoic Acid Induced 1 (RAI1) Mutations Associated with Smith-Magenis Syndrome». *BMC Molecular Biology* 11 (25 de Agosto de 2010): 63. doi:10.1186/1471-2199-11-63.
- Carvill, Gemma L., e Heather C. Mefford. «Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability». *Journal of Pediatric Genetics* 4, n. 3 (Setembro de 2015): 128–35. doi:10.1055/s-0035-1564439.
- Caspersson, T., L. Zech, C. Johansson, e E. J. Modest. «Identification of Human Chromosomes by DNA-Binding Fluorescent Agents». *Chromosoma* 30, n.º 2 (1970): 215–27.
- Cassidy, Suzanne B., Stuart Schwartz, Jennifer L. Miller, e Daniel J. Driscoll. «Prader-Willi Syndrome». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 26 de Setembro de 2011. doi:10.1097/GIM.0b013e31822bead0.
- Chelly, Jamel, Malik Khelfaoui, Fiona Francis, Beldjord Chérif, e Thierry Bienvenu. «Genetics and Pathophysiology of Mental Retardation». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 14, n. 6 (Junho de 2006): 701–13. doi:10.1038/sj.ejhg.5201595.
- Cheung, V. G., N. Nowak, W. Jang, I. R. Kirsch, S. Zhao, X. N. Chen, T. S. Furey, et al. «Integration of Cytogenetic Landmarks into the Draft Sequence of the Human Genome». *Nature* 409, n. 6822 (15 de Fevereiro de 2001): 953–58. doi:10.1038/35057192.
- Chiurazzi, Pietro, e Filomena Pirozzi. «Advances in Understanding - Genetic Basis of Intellectual Disability». *F1000Research* 5 (2016). doi:10.12688/f1000research.7134.1.
- Choy, K. W., S. R. Setlur, C. Lee, e T. K. Lau. «The Impact of Human Copy Number Variation on a New Era of Genetic Testing». *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 117, n. 4 (Março de 2010): 391–98. doi:10.1111/j.1471-0528.2009.02470.x.
- Ciuladaitė, Zivilė, Jūratė Kasnauskienė, Loreta Cimbalistienė, Eglė Preikšaitienė, Philippos C. Patsalis, e Vaidutis Kučinskas. «Mental Retardation and Autism Associated with Recurrent 16p11.2 Microdeletion: Incomplete Penetrance and Variable Expressivity». *Journal of Applied Genetics* 52, n. 4 (Novembro de 2011): 443–49. doi:10.1007/s13353-011-0063-z.
- Coe, Bradley P., Kali Witherspoon, Jill A. Rosenfeld, Bregje W. M. van Bon, Anneke T. Vulto-van Silfhout, Paolo Bosco, Kathryn L. Friend, et al. «Refining Analyses of Copy Number Variation Identifies Specific Genes Associated with Developmental Delay». *Nature Genetics* 46, n. 10 (Outubro de 2014): 1063–71. doi:10.1038/ng.3092.
- Conrad, Donald F., Dalila Pinto, Richard Redon, Lars Feuk, Omer Gokcumen, Yujun Zhang, Jan Aerts, et al. «Origins and Functional Impact of Copy Number Variation in the Human Genome». *Nature* 464, n. 7289 (1 de Abril de 2010): 704–12. doi:10.1038/nature08516.
- Conlin, Laura K., Brian D. Thiel, Carsten G. Bonnemann, Livija Medne, Linda M. Ernst, Elaine H. Zackai, Matthew A. Deardorff, Ian D. Krantz, Hakon Hakonarson, e Nancy B. Spinner. «Mechanisms of Mosaicism, Chimerism and Uniparental Disomy Identified by Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis». *Human Molecular Genetics* 19, n.º 7 (1.º de abril de 2010): 1263–75. doi:10.1093/hmg/ddq003.
- Cooper, Gregory M., Bradley P. Coe, Santhosh Girirajan, Jill A. Rosenfeld, Tiffany H. Vu, Carl Baker, Charles Williams, et al. «A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay». *Nature Genetics* 43, n. 9 (Setembro de 2011): 838–46. doi:10.1038/ng.909.
- Crotwell, Patricia L., e H. Eugene Hoyme. «Advances in Whole-Genome Genetic Testing: From Chromosomes to Microarrays». *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 42, n. 3 (Março de 2012): 47–73. doi:10.1016/j.cppeds.2011.10.004.
- Curry, C. J., R. E. Stevenson, D. Aughton, J. Byrne, J. C. Carey, S. Cassidy, C. Cunliffe, et al. «Evaluation of Mental Retardation: Recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics». *American Journal of Medical Genetics* 72, n. 4 (12 de Novembro de 1997): 468–77.

- D'Amours, Guylaine, Mathieu Langlois, Géraldine Mathonnet, Raouf Fetni, Sonia Nizard, Myriam Srour, Frédérique Tihy, Michael S. Phillips, Jacques L. Michaud, e Emmanuelle Lemyre. «SNP Arrays: Comparing Diagnostic Yields for Four Platforms in Children with Developmental Delay». *BMC Medical Genomics* 7 (2014): 70. doi:10.1186/s12920-014-0070-0.
- Dave, Bhavana J., e Warren G. Sanger. «Role of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics in the Diagnosis of Genetic Imbalances». *Seminars in Pediatric Neurology* 14, n. 1 (Março de 2007): 2–6. doi:10.1016/j.spen.2006.11.003.
- Grouchy, J. de, C. Turleau, e C. Léonard. «[Study by fluorescence of a trisomy C mosaic, probably 8: 46,XY-47,XY,?8+]». *Annales De Genetique* 14, n° 1 (março de 1971): 69–72.
- Ligt, Joep de, Marjolein H. Willemsen, Bregje W. M. van Bon, Tjitske Kleefstra, Helger G. Yntema, Thessa Kroes, Anneke T. Vulto-van Silfhout, et al. «Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability». *The New England Journal of Medicine* 367, n° 20 (15 de novembro de 2012): 1921–29. doi:10.1056/NEJMoa1206524.
- Smith, A. J. de, R. G. Walters, P. Froguel, e A. I. Blakemore. «Human Genes Involved in Copy Number Variation: Mechanisms of Origin, Functional Effects and Implications for Disease». *Cytogenetic and Genome Research* 123, n° 1–4 (2008): 17–26. doi:10.1159/000184688.
- Vries, Bert B. A. de, Rolph Pfundt, Martijn Leisink, David A. Koolen, Lisenka E. L. M. Vissers, Irene M. Janssen, Simon van Reijmersdal, et al. «Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation». *American Journal of Human Genetics* 77, n° 4 (outubro de 2005): 606–16. doi:10.1086/491719.
- Digilio, Mc, B. Marino, R. Capolino, e B. Dallapiccola. «Clinical Manifestations of Deletion 22q11.2 Syndrome (DiGeorge/Velo-Cardio-Facial Syndrome)». *Images in Paediatric Cardiology* 7, n. 2 (Abril de 2005): 23–34.
- Dubourg, Christèle, Damien Sanlaville, Martine Doco-Fenzy, Cédric Le Caignec, Chantal Missirian, Sylvie Jaillard, Caroline Schluth-Bolard, et al. «Clinical and Molecular Characterization of 17q21.31 Microdeletion Syndrome in 14 French Patients with Mental Retardation». *European Journal of Medical Genetics* 54, n. 2 (Abril de 2011): 144–51. doi:10.1016/j.ejmg.2010.11.003.
- Durkin, M. S., N. Z. Khan, L. L. Davidson, S. Huq, S. Munir, E. Rasul, e S. S. Zaman. «Prenatal and Postnatal Risk Factors for Mental Retardation among Children in Bangladesh». *American Journal of Epidemiology* 152, n. 11 (1 de Dezembro de 2000): 1024–33.
- Durkin, Maureen. «The Epidemiology of Developmental Disabilities in Low-Income Countries». *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8, n. 3 (2002): 206–11. doi:10.1002/mrdd.10039.
- Durmaz, Asude Alpman, Emin Karaca, Urszula Demkow, Gokce Toruner, Jacqueline Schoumans, e Ozgur Cogulu. «Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and beyond». *BioMed Research International* 2015 (2015): 461524. doi:10.1155/2015/461524.
- Dutta, Usha R. «The History of Human Cytogenetics in India-A Review». *Gene* 589, n. 2 (10 de Setembro de 2016): 112–17. doi:10.1016/j.gene.2016.01.052.
- Edwards, J. H., D. G. Harnden, A. H. Cameron, V. M. Crosse, e O. H. Wolff. «A New Trisomic Syndrome». *Lancet (London, England)* 1, n. 7128 (9 de Abril de 1960): 787–90.
- Elsa, Sarah H., e Santhosh Girirajan. «Smith-Magenis Syndrome». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 16, n. 4 (Abril de 2008): 412–21. doi:10.1038/sj.ejhg.5202009.
- Elsa, Sarah H., e Stephen R. Williams. «Smith-Magenis Syndrome: Haploinsufficiency of RAI1 Results in Altered Gene Regulation in Neurological and Metabolic Pathways». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13 (19 de Abril de 2011): e14. doi:10.1017/S1462399411001827.

- Emy Dorfman, Luiza, Júlio César L. Leite, Roberto Giugliani, e Mariluce Riegel. "Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis in Neonates with Congenital Anomalies: Detection of Chromosomal Imbalances". *Jornal De Pediatria* 91, n° 1 (fevereiro de 2015): 59–67. doi:10.1016/j.jped.2014.05.007.
- Fan, Yao-Shan, Xiaomei Ouyang, Jinghong Peng, Stephanie Sacharow, Mustafa Tekin, Deborah Barbouth, Olaf Bodamer, et al. «Frequent Detection of Parental Consanguinity in Children with Developmental Disorders by a Combined CGH and SNP Microarray». *Molecular Cytogenetics* 6, n. 1 (20 de Setembro de 2013): 38. doi:10.1186/1755-8166-6-38.
- Ferguson-Smith, Malcolm A. «History and Evolution of Cytogenetics». *Molecular Cytogenetics* 8 (2015): 19. doi:10.1186/s13039-015-0125-8.
- Fernández, M. A., e D. Morillo Rojas. «[Almost asymptomatic 18p deletion syndrome]». *Anales De Pediatria (Barcelona, Spain: 2003)* 71, n. 3 (Setembro de 2009): 278–79. doi:10.1016/j.anpedi.2009.06.006.
- Feuk, Lars, Andrew R. Carson, e Stephen W. Scherer. «Structural Variation in the Human Genome». *Nature Reviews. Genetics* 7, n. 2 (Fevereiro de 2006): 85–97. doi:10.1038/nrg1767.
- Firth, Helen V., Shola M. Richards, A. Paul Bevan, Stephen Clayton, Manuel Corpas, Diana Rajan, Steven Van Vooren, Yves Moreau, Roger M. Pettett, e Nigel P. Carter. «DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources». *American Journal of Human Genetics* 84, n. 4 (Abril de 2009): 524–33. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.010.
- Flint, J., A. O. Wilkie, V. J. Buckle, R. M. Winter, A. J. Holland, e H. E. McDermid. «The Detection of Subtelomeric Chromosomal Rearrangements in Idiopathic Mental Retardation». *Nature Genetics* 9, n. 2 (Fevereiro de 1995): 132–40. doi:10.1038/ng0295-132.
- Flint, Jonathan, e Samantha Knight. «The Use of Telomere Probes to Investigate Submicroscopic Rearrangements Associated with Mental Retardation». *Current Opinion in Genetics & Development* 13, n. 3 (Junho de 2003): 310–16.
- Friedman, J. M., Agnes Baross, Allen D. Delaney, Adrian Ally, Laura Arbour, Linlea Armstrong, Jennifer Asano, et al. «Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation». *American Journal of Human Genetics* 79, n° 3 (setembro de 2006): 500–513. doi:10.1086/507471.
- Gall, J. G., e M. L. Pardue. «Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63, n. 2 (Junho de 1969): 378–83.
- Gartler, Stanley M. «The Chromosome Number in Humans: A Brief History». *Nature Reviews. Genetics* 7, n. 8 (Agosto de 2006): 655–60. doi:10.1038/nrg1917.
- Gialluisi, Alessandro, Alessia Visconti, Erik G. Willcutt, Shelley D. Smith, Bruce F. Pennington, Mario Falchi, John C. DeFries, Richard K. Olson, Clyde Francks, e Simon E. Fisher. «Investigating the Effects of Copy Number Variants on Reading and Language Performance». *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 8 (2016): 17. doi:10.1186/s11689-016-9147-8.
- Gijsbers, A. C. J., J. Schoumans, e C. a. L. Ruivenkamp. «Interpretation of Array Comparative Genome Hybridization Data: A Major Challenge». *Cytogenetic and Genome Research* 135, n. 3–4 (2011): 222–27. doi:10.1159/000334066.
- Gilissen, Christian, Jayne Y. Hehir-Kwa, Djie Tjwan Thung, Maartje van de Vorst, Bregje W. M. van Bon, Marjolein H. Willemsen, Michael Klint, et al. «Genome Sequencing Identifies Major Causes of Severe Intellectual Disability». *Nature* 511, n. 7509 (17 de Julho de 2014): 344–47. doi:10.1038/nature13394.
- Giorgio, Elisa, Andrea Ciolfi, Elisa Biamino, Viviana Caputo, Eleonora Di Gregorio, Elga Fabia Belligni, Alessandro Calcia, et al. «Whole Exome Sequencing Is Necessary to Clarify ID/DD Cases with de Novo Copy Number Variants of Uncertain Significance: Two Proof-of-Concept Examples». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 170, n. 7 (Julho de 2016): 1772–79. doi:10.1002/ajmg.a.37649.

- Girirajan, Santhosh, Christopher N. Vlangos, Barbara B. Szomju, Emily Edelman, Christopher D. Trevors, Lucie Dupuis, Marjan Nezarati, David J. Bunyan, e Sarah H. Elsea. «Genotype-Phenotype Correlation in Smith-Magenis Syndrome: Evidence That Multiple Genes in 17p11.2 Contribute to the Clinical Spectrum». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 8, n. 7 (Julho de 2006): 417–27. doi:10.109701.gim.0000228215.32110.89.
- Gondek, Lukasz P., Ramon Tiu, Christine L. O’Keefe, Mikkael A. Sekeres, Karl S. Theil, e Jaroslaw P. Maciejewski. «Chromosomal Lesions and Uniparental Disomy Detected by SNP Arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-Derived AML». *Blood* 111, n° 3 (1° de fevereiro de 2008): 1534–42. doi:10.1182/blood-2007-05-092304.
- Grayton, Hannah M., Cathy Fernandes, Dan Rujescu, e David A. Collier. «Copy Number Variations in Neurodevelopmental Disorders». *Progress in Neurobiology* 99, n. 1 (Outubro de 2012): 81–91. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.07.005.
- Gropman et al. 2007
- Guerin, Andrea, Dimitri J. Stavropoulos, Yaser Diab, Sébastien Chénier, Hilary Christensen, Walter H. A. Kahr, Riyana Babul-Hirji, e David Chitayat. «Interstitial Deletion of 11q- Implicating the KIRREL3 Gene in the Neurocognitive Delay Associated with Jacobsen Syndrome». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158A, n. 10 (Outubro de 2012): 2551–56. doi:10.1002/ajmg.a.35621.
- Gupta, Rekha, Neerja Gupta, Sheela Nampoothiri, Kausik Mandal, Yougal Kishore, Pankaj Sharma, Madhulika Kabra, e Shubha R. Phadke. «Smith-Magenis Syndrome: Face Speaks». *Indian Journal of Pediatrics* 83, n. 6 (Junho de 2016): 589–93. doi:10.1007/s12098-015-1940-y.
- Haldeman-Englert, Chad R., Taiyabah Naeem, Elizabeth A. Geiger, Ashley Warnock, Holly Feret, Melissa Ciano, Stefanie L. Davidson, Matthew A. Deardorff, Elaine H. Zackai, e Tamim H. Shaikh. «A 781-Kb Deletion of 13q12.3 in a Patient with Peters plus Syndrome». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 149A, n. 8 (Agosto de 2009): 1842–45. doi:10.1002/ajmg.a.32980.
- Hamamy, Hanan, Stylianos E. Antonarakis, Luigi Luca Cavalli-Sforza, Samia Temtamy, Giovanni Romeo, Leo P. Ten Kate, Robin L. Bennett, et al. «Consanguineous Marriages, Pearls and Perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 13, n. 9 (Setembro de 2011): 841–47. doi:10.1097/GIM.0b013e318217477f.
- Hamerton, John L. «Chicago Conference 1966: Standardization in Human Cytogenetics». *Journal of Medical Genetics* 4, n. 3 (Setembro de 1967): 226
- Hanemaaijer, Nicolien M., Birgit Sikkema-Raddatz, Gerben van der Vries, Trijnie Dijkhuizen, Roel Hordijk, Anthonie J. van Essen, Hermine E. Veenstra-Knol, et al. «Practical Guidelines for Interpreting Copy Number Gains Detected by High-Resolution Array in Routine Diagnostics». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 20, n. 2 (Fevereiro de 2012): 161–65. doi:10.1038/ejhg.2011.174.
- Hansson, Kerstin, Karoly Szuhai, Jeroen Knijnenburg, Arie van Haeringen, e Joke de Pater. «Interstitial Deletion of 6q without Phenotypic Effect». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143A, n. 12 (15 de Junho de 2007): 1354–57. doi:10.1002/ajmg.a.31783.
- Hasi-Zogaj, Minire, Courtney Sebold, Patricia Heard, Erika Carter, Bridgette Soileau, Annice Hill, David Rupert, et al. «A Review of 18p Deletions». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 169, n. 3 (Setembro de 2015): 251–64. doi:10.1002/ajmg.c.31445.
- Hehir-Kwa, J. Y., R. Pfundt, J. A. Veltman, e N. de Leeuw. «Pathogenic or Not? Assessing the Clinical Relevance of Copy Number Variants». *Clinical Genetics* 84, n. 5 (Novembro de 2013): 415–21. doi:10.1111/cge.12242.
- Henrichsen, Charlotte N., Evelyne Chaignat, e Alexandre Reymond. «Copy Number Variants, Diseases and Gene Expression». *Human Molecular Genetics* 18, n. R1 (15 de Abril de 2009): R1-8. doi:10.1093/hmg/ddp011.

- Hochstenbach, Ron, Ellen van Binsbergen, John Engelen, Aggie Nieuwint, Abeltje Polstra, Pino Poddighe, Claudia Ruivenkamp, Birgit Sikkema-Raddatz, Dominique Smeets, e Martin Poot. «Array Analysis and Karyotyping: Workflow Consequences Based on a Retrospective Study of 36,325 Patients with Idiopathic Developmental Delay in the Netherlands». *European Journal of Medical Genetics* 52, n. 4 (Agosto de 2009): 161–69. doi:10.1016/j.ejmg.2009.03.015.
- Hollenbeck, Dana, Crescenda L. Williams, Kathryn Drazba, Maria Descartes, Bruce R. Korf, S. Lane Rutledge, Edward J. Lose, Nathaniel H. Robin, Andrew J. Carroll, e Fady M. Mikhail. «Clinical Relevance of Small Copy-Number Variants in Chromosomal Microarray Clinical Testing». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15 de Setembro de 2016. doi:10.1038/gim.2016.132.
- Hollox, Edward J., e Boon-Peng Hoh. «Human Gene Copy Number Variation and Infectious Disease». *Human Genetics* 133, n. 10 (Outubro de 2014): 1217–33. doi:10.1007/s00439-014-1457-x.
- Horimoto, Andréa R. V. Russo, Márcio T. Onodera, e Paulo A. Otto. «PENCALC: A Program for Penetrance Estimation in Autosomal Dominant Diseases». *Genetics and Molecular Biology* 33, nº 3 (julho de 2010): 455–59. doi:10.1590/S1415-47572010005000054.
- Howell, Katherine B., Andrew J. Kornberg, A. Simon Harvey, Monique M. Ryan, Mark T. Mackay, Jeremy L. Freeman, M. Victoria Rodriguez Casero, et al. «High Resolution Chromosomal Microarray in Undiagnosed Neurological Disorders». *Journal of Paediatrics and Child Health* 49, n. 9 (Setembro de 2013): 716–24. doi:10.1111/jpc.12256.
- Huang, Wei-Hsiang, Casey J. Guenthner, Jin Xu, Tiffany Nguyen, Lindsay A. Schwarz, Alex W. Wilkinson, Or Gozani, Howard Y. Chang, Mehrdad Shamloo, e Liquan Luo. «Molecular and Neural Functions of Rai1, the Causal Gene for Smith-Magenis Syndrome». *Neuron* 92, n. 2 (19 de Outubro de 2016): 392–406. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.019.
- Hunter, A. G. «Outcome of the Routine Assessment of Patients with Mental Retardation in a Genetics Clinic». *American Journal of Medical Genetics* 90, n. 1 (3 de Janeiro de 2000): 60–68.
- Iafrate, A. John, Lars Feuk, Miguel N. Rivera, Marc L. Listewnik, Patricia K. Donahoe, Ying Qi, Stephen W. Scherer, e Charles Lee. «Detection of Large-Scale Variation in the Human Genome». *Nature Genetics* 36, n. 9 (Setembro de 2004): 949–51. doi:10.1038/ng1416.
- IBGE. «IBGE. Censo 2010», 2010. <http://censo2010.ibge.gov.br/>.
- Inoue, K., K. Dewar, N. Katsanis, L. T. Reiter, E. S. Lander, K. L. Devon, D. W. Wyman, J. R. Lupski, e B. Birren. «The 1.4-Mb CMT1A duplication/HNPP Deletion Genomic Region Reveals Unique Genome Architectural Features and Provides Insights into the Recent Evolution of New Genes». *Genome Research* 11, n. 6 (Junho de 2001): 1018–33. doi:10.1101/gr.180401.
- Iselius, L., J. Lindsten, A. Aurias, M. Fraccaro, C. Bastard, A. M. Bottelli, T. H. Bui, D. Caufin, L. Dalprà, e N. Delendi. «The 11q;22q Translocation: A Collaborative Study of 20 New Cases and Analysis of 110 Families». *Human Genetics* 64, nº 4 (1983): 343–55.
- Iyer, Janani, e Santhosh Girirajan. «Gene Discovery and Functional Assessment of Rare Copy-Number Variants in Neurodevelopmental Disorders». *Briefings in Functional Genomics* 14, n. 5 (Setembro de 2015): 315–28. doi:10.1093/bfgp/eli018.
- Jacobs, P. A., e J. A. Strong. «A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism». *Nature* 183, n. 4657 (31 de Janeiro de 1959): 302–3.
- Jehee, Fernanda Sarquis, Jean Tetsuo Takamori, Paula F. Vasconcelos Medeiros, Ana Carolina B. Pordeus, Flavia Roche M. Latini, Débora Romeo Bertola, Chong Ae Kim, e Maria Rita Passos-Bueno. «Using a Combination of MLPA Kits to Detect Chromosomal Imbalances in Patients with Multiple Congenital Anomalies and Mental Retardation Is a Valuable Choice for Developing Countries». *European Journal of Medical Genetics* 54, n. 4 (Agosto de 2011): e425-432. doi:10.1016/j.ejmg.2011.03.007.

- Jacobs, P. A., e J. A. Strong. "A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism". *Nature* 183, n° 4657 (31 de janeiro de 1959): 302–3.
- Jacquemont, Sébastien, Bradley P. Coe, Micha Hersch, Michael H. Duyzend, Niklas Krumm, Sven Bergmann, Jacques S. Beckmann, Jill A. Rosenfeld, e Evan E. Eichler. "A Higher Mutational Burden in Females Supports A 'female Protective Model' in Neurodevelopmental Disorders". *American Journal of Human Genetics* 94, n° 3 (6 de março de 2014): 415–25. doi:10.1016/j.ajhg.2014.02.001.
- Jez, Stephanie, Megan Martin, Sarah South, Rena Vanzo, e Erin Rothwell. «Variants of Unknown Significance on Chromosomal Microarray Analysis: Parental Perspectives». *Journal of Community Genetics* 6, n. 4 (Outubro de 2015): 343–49. doi:10.1007/s12687-015-0218-4.
- Kahrizi, Kimia, Cougar Hao Hu, Masoud Garshasbi, Seyedeh Sedigheh Abedini, Shirin Ghadami, Roxana Kariminejad, Reinhard Ullmann, et al. «Next Generation Sequencing in a Family with Autosomal Recessive Kahrizi Syndrome (OMIM 612713) Reveals a Homozygous Frameshift Mutation in SRD5A3». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 19, n. 1 (Janeiro de 2011): 115–17. doi:10.1038/ejhg.2010.132.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray, F. Waldman, e D. Pinkel. «Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors». *Science (New York, N.Y.)* 258, n. 5083 (30 de Outubro de 1992): 818–21.
- Kaminsky, Erin B., Vineith Kaul, Justin Paschall, Deanna M. Church, Brian Bunke, Dawn Kunig, Daniel Moreno-De-Luca, et al. «An Evidence-Based Approach to Establish the Functional and Clinical Significance of Copy Number Variants in Intellectual and Developmental Disabilities». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 13, n. 9 (Setembro de 2011): 777–84. doi:10.1097/GIM.0b013e31822c79f9.
- Karampetsou, Evangelia, Deborah Morrogh, e Lyn Chitty. «Microarray Technology for the Diagnosis of Fetal Chromosomal Aberrations: Which Platform Should We Use?». *Journal of Clinical Medicine* 3, n. 2 (2014): 663–78. doi:10.3390/jcm3020663.
- Kashevarova, Anna A., Lyudmila P. Nazarenko, Soren Schultz-Pedersen, Nikolay A. Skryabin, Olga A. Salyukova, Nataliya N. Chechetkina, Ekaterina N. Tolmacheva, et al. «Single Gene Microdeletions and Microduplication of 3p26.3 in Three Unrelated Families: CNTN6 as a New Candidate Gene for Intellectual Disability». *Molecular Cytogenetics* 7, n. 1 (2014): 97. doi:10.1186/s13039-014-0097-0.
- Kaufman, Liana, Muhammad Ayub, e John B. Vincent. «The Genetic Basis of Non-Syndromic Intellectual Disability: A Review». *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2, n. 4 (Dezembro de 2010): 182–209. doi:10.1007/s11689-010-9055-2.
- Kearney, Hutton M., Joseph B. Kearney, e Laura K. Conlin. «Diagnostic Implications of Excessive Homozygosity Detected by SNP-Based Microarrays: Consanguinity, Uniparental Disomy, and Recessive Single-Gene Mutations». *Clinics in Laboratory Medicine* 31, n. 4 (Dezembro de 2011): 595–613, ix. doi:10.1016/j.cll.2011.08.003.
- Kearney, Hutton M., Erik C. Thorland, Kerry K. Brown, Fabiola Quintero-Rivera, Sarah T. South, e Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. «American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Interpretation and Reporting of Postnatal Constitutional Copy Number Variants». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 13, n. 7 (Julho de 2011): 680–85. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a.
- Kearney, L. «Molecular Cytogenetics». *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 14, n. 3 (Setembro de 2001): 645–69. doi:10.1053/beha.2001.0159.
- Kim, Eun Hee, Mi Sun Yum, Beom Hee Lee, Hyo Won Kim, Hyun Jeoung Lee, Gu Hwan Kim, Yun Jeong Lee, Han Wook Yoo, e Tae Sung Ko. «Epilepsy and Other Neuropsychiatric Manifestations in Children and Adolescents with 22q11.2 Deletion Syndrome». *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)* 12, n. 1 (Janeiro de 2016): 85–92. doi:10.3988/jcn.2016.12.1.85.

- Kirchhoff, Maria, Anne-Marie Bisgaard, Thue Bryndorf, e Tommy Gerdes. «MLPA Analysis for a Panel of Syndromes with Mental Retardation Reveals Imbalances in 5.8% of Patients with Mental Retardation and Dysmorphic Features, Including Duplications of the Sotos Syndrome and Williams-Beuren Syndrome Regions». *European Journal of Medical Genetics* 50, n. 1 (Fevereiro de 2007): 33–42. doi:10.1016/j.ejmg.2006.10.002.
- Kirin, Mirna, Ruth McQuillan, Christopher S. Franklin, Harry Campbell, Paul M. McKeigue, e James F. Wilson. «Genomic Runs of Homozygosity Record Population History and Consanguinity». *PloS One* 5, n.º 11 (15 de novembro de 2010): e13996. doi:10.1371/journal.pone.0013996.
- Kleefstra, T., W. A. van Zelst-Stams, W. M. Nillesen, V. Cormier-Daire, G. Houge, N. Foulds, M. van Dooren, et al. «Further Clinical and Molecular Delineation of the 9q Subtelomeric Deletion Syndrome Supports a Major Contribution of EHMT1 Haploinsufficiency to the Core Phenotype». *Journal of Medical Genetics* 46, n. 9 (Setembro de 2009): 598–606. doi:10.1136/jmg.2008.062950.
- Klugman, Susan, Barrie Suskin, Brianna L. Spencer, Pe'er Dar, Komal Bajaj, Judith Powers, Julie Reichling, David Wasserman, Siobhan M. Dolan, e Irwin R. Merkatz. «Clinical Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis: Report of First 6 Months in Clinical Practice». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 27, n. 13 (Setembro de 2014): 1333–38. doi:10.3109/14767058.2013.858243.
- Knight, S. J., R. Regan, A. Nicod, S. W. Horsley, L. Kearney, T. Homfray, R. M. Winter, P. Bolton, e J. Flint. «Subtle Chromosomal Rearrangements in Children with Unexplained Mental Retardation». *Lancet (London, England)* 354, n. 9191 (13 de Novembro de 1999): 1676–81. doi:10.1016/S0140-6736(99)03070-6.
- Koolen, D. A., W. M. Nillesen, M. H. A. Versteeg, G. F. M. Merks, N. V. a. M. Knoers, M. Kets, S. Vermeer, et al. «Screening for Subtelomeric Rearrangements in 210 Patients with Unexplained Mental Retardation Using Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)». *Journal of Medical Genetics* 41, n. 12 (Dezembro de 2004): 892–99. doi:10.1136/jmg.2004.023671.
- Koolen, D. A., A. J. Sharp, J. A. Hurst, H. V. Firth, S. J. L. Knight, A. Goldenberg, P. Saugier-Verber, et al. «Clinical and Molecular Delineation of the 17q21.31 Microdeletion Syndrome». *Journal of Medical Genetics* 45, n. 11 (Novembro de 2008): 710–20. doi:10.1136/jmg.2008.058701.
- Koolen, David A., Rolph Pfundt, Nicole de Leeuw, Jayne Y. Hehir-Kwa, Willy M. Nillesen, Ineke Neefs, Ine Scheltinga, et al. «Genomic Microarrays in Mental Retardation: A Practical Workflow for Diagnostic Applications». *Human Mutation* 30, n. 3 (Março de 2009): 283–92. doi:10.1002/humu.20883.
- Koolen, David A., Rolph Pfundt, Katrin Linda, Gea Beunders, Hermine E. Veenstra-Knol, Jessie H. Conta, Ana Maria Fortuna, et al. «The Koolen-de Vries Syndrome: A Phenotypic Comparison of Patients with a 17q21.31 Microdeletion versus a KANSL1 Sequence Variant». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 24, n. 5 (Maio de 2016): 652–59. doi:10.1038/ejhg.2015.178.
- Koolen, David A., Lisenka E. L. M. Vissers, Rolph Pfundt, Nicole de Leeuw, Samantha J. L. Knight, Regina Regan, R. Frank Kooy, et al. «A New Chromosome 17q21.31 Microdeletion Syndrome Associated with a Common Inversion Polymorphism». *Nature Genetics* 38, n. 9 (Setembro de 2006): 999–1001. doi:10.1038/ng1853.
- Koshy, Beena, Kausik Mandal, Vivi M. Srivastava, Preeti T. Loius, e Sumita Danda. «Familial 18p Deletion Syndrome and 18p Partial Trisomy Inherited from a Mother with Balanced Translocation». *Clinical Dysmorphology* 20, n. 3 (Julho de 2011): 148–51. doi:10.1097/MCD.0b013e328343b9b9.
- Kosyakova, Nadezda, Anja Weise, Kristin Mrasek, Uwe Claussen, Thomas Liehr, e Heike Nelle. «The Hierarchically Organized Splitting of Chromosomal Bands for All Human

- Chromosomes». *Molecular Cytogenetics* 2 (26 de Janeiro de 2009): 4. doi:10.1186/1755-8166-2-4.
- Krepischi-Santos, A. C. V., A. M. Vianna-Morgante, F. S. Jehee, M. R. Passos-Bueno, J. Knijnenburg, K. Szuhai, W. Sloos, et al. «Whole-Genome Array-CGH Screening in Undiagnosed Syndromic Patients: Old Syndromes Revisited and New Alterations». *Cytogenetic and Genome Research* 115, n. 3–4 (2006): 254–61. doi:10.1159/000095922.
- Kriek, M., S. J. White, M. C. Bouma, H. G. Dauwerse, K. B. M. Hansson, J. V. Nijhuis, B. Bakker, G.-J. B. van Ommen, J. T. den Dunnen, e M. H. Breuning. «Genomic Imbalances in Mental Retardation». *Journal of Medical Genetics* 41, n. 4 (Abril de 2004): 249–55.
- Kriek, Marjolein, Stefan J. White, Karoly Szuhai, Jeroen Knijnenburg, Gert-Jan B. van Ommen, Johan T. den Dunnen, e Martijn H. Breuning. «Copy Number Variation in Regions Flanked (or Unflanked) by Duplicons among Patients with Developmental Delay And/Or Congenital Malformations; Detection of Reciprocal and Partial Williams-Beuren Duplications». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 14, n° 2 (fevereiro de 2006): 180–89. doi:10.1038/sj.ejhg.5201540.
- Kruglyak, L., e D. A. Nickerson. «Variation Is the Spice of Life». *Nature Genetics* 27, n° 3 (março de 2001): 234–36. doi:10.1038/85776.
- Ku, Chee Seng, Nasheen Naidoo, Shu Mei Teo, e Yudi Pawitan. «Regions of Homozygosity and Their Impact on Complex Diseases and Traits». *Human Genetics* 129, n. 1 (Janeiro de 2011): 1–15. doi:10.1007/s00439-010-0920-6.
- Kumar, Ravinesh A., Samer KaraMohamed, Jyotsna Sudi, Donald F. Conrad, Camille Brune, Judith A. Badner, T. Conrad Gilliam, et al. «Recurrent 16p11.2 Microdeletions in Autism». *Human Molecular Genetics* 17, n. 4 (15 de Fevereiro de 2008): 628–38. doi:10.1093/hmg/ddm376.
- LaFramboise, Thomas. «Single Nucleotide Polymorphism Arrays: A Decade of Biological, Computational and Technological Advances». *Nucleic Acids Research* 37, n. 13 (Julho de 2009): 4181–93. doi:10.1093/nar/gkp552.
- Langer, P. R., A. A. Waldrop, e D. C. Ward. «Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, n. 11 (Novembro de 1981): 6633–37.
- Lee et al. 2007
- Le Scouarnec, S., e S. M. Gribble. «Characterising Chromosome Rearrangements: Recent Technical Advances in Molecular Cytogenetics». *Heredity* 108, n. 1 (Janeiro de 2012): 75–85. doi:10.1038/hdy.2011.100.
- Lee, Cha Gon, Sang-Jin Park, Jun-No Yun, Jung Min Ko, Hyon-Ju Kim, Shin-Young Yim, e Young Bae Sohn. «Array-Based Comparative Genomic Hybridization in 190 Korean Patients with Developmental Delay And/or Intellectual Disability: A Single Tertiary Care University Center Study». *Yonsei Medical Journal* 54, n. 6 (Novembro de 2013): 1463–70. doi:10.3349/ymj.2013.54.6.1463.
- Lee, Charles. «Chapter 10 - Structural Genomic Variation in the Human Genome». Em *Genomic and Personalized Medicine (Second Edition)*, editado por Geoffrey S. Ginsburg e Huntington F. Willard, 123–32. Academic Press, 2013. //www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822277000100.
- Lee, Charles, A. John Iafrate, e Arthur R. Brothman. «Copy Number Variations and Clinical Cytogenetic Diagnosis of Constitutional Disorders». *Nature Genetics* 39, n. 7 Suppl (Julho de 2007): S48-54. doi:10.1038/ng2092.
- Lee, Charles, e Stephen W. Scherer. «The Clinical Context of Copy Number Variation in the Human Genome». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12 (2010): e8. doi:10.1017/S1462399410001390.
- Lejeune, J., R. Turpin, e M. Gautier. «[Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]». *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 143, n. 11–12 (7 de Abril de 1959): 256–65.

- Leung, Tak Yeung, Ritsuko K. Pooh, Chi Chiu Wang, Tze Kin Lau, e Kwong Wai Choy. «Classification of Pathogenic or Benign Status of CNVs Detected by Microarray Analysis». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 10, n. 6
- Lonardo, Fortunato, Lucia Perone, Marianna Maioli, Maria Ciavarella, Roberto Ciccone, Matteo Della Monica, Cinzia Lombardi, et al. «Clinical, Cytogenetic and Molecular-Cytogenetic Characterization of a Patient with a de Novo Tandem Proximal-Intermediate Duplication of 16q and Review of the Literature». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A, n. 4 (Abril de 2011): 769–77. doi:10.1002/ajmg.a.33852.
- Lupski, James R., e Pawel Stankiewicz. «Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes». *PLoS Genetics* 1, n. 6 (Dezembro de 2005): e49. doi:10.1371/journal.pgen.0010049.
- MacDonald, Jeffrey R., Robert Ziman, Ryan K. C. Yuen, Lars Feuk, e Stephen W. Scherer. «The Database of Genomic Variants: A Curated Collection of Structural Variation in the Human Genome». *Nucleic Acids Research* 42, n. Database issue (Janeiro de 2014): D986-992. doi:10.1093/nar/gkt958.
- Machado, T. M. B., T. F. Bomfim, L. V. Souza, N. Soares, F. L. Santos, A. X. Acosta, e K. Abe-Sandes. «Types of Marriages, Population Structure and Genetic Disease». *Journal of Biosocial Science* 45, n. 4 (Julho de 2013): 461–70. doi:10.1017/S0021932012000673.
- Maeder, Johanna, Maude Schneider, Mathilde Bostelmann, Martin Debbané, Bronwyn Glaser, Sarah Menghetti, Marie Schaer, e Stephan Eliez. «Developmental Trajectories of Executive Functions in 22q11.2 Deletion Syndrome». *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 8 (2016): 10. doi:10.1186/s11689-016-9141-1.
- Männik, Katrin, Reedik Mägi, Aurélien Macé, Ben Cole, Anna L. Guyatt, Hashem A. Shihab, Anne M. Maillard, et al. «Copy Number Variations and Cognitive Phenotypes in Unselected Populations». *JAMA* 313, n. 20 (26 de Maio de 2015): 2044–54. doi:10.1001/jama.2015.4845.
- Manning, Melanie, Louanne Hudgins, e Professional Practice and Guidelines Committee. «Array-Based Technology and Recommendations for Utilization in Medical Genetics Practice for Detection of Chromosomal Abnormalities». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12, n. 11 (Novembro de 2010): 742–45. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f8baad.
- Maranda, Bruno, Nicole Lemieux, e Emmanuelle Lemyre. «Familial Deletion 18p Syndrome: Case Report». *BMC Medical Genetics* 7 (14 de Julho de 2006): 60. doi:10.1186/1471-2350-7-60.
- Maris, Angelica Francesca, Ingrid Tremel Barbato, Alexis Trott, e Marco Aurélio Echart Montano. «Familial Mental Retardation: A Review and Practical Classification». *Ciência & Saúde Coletiva* 18, n. 6 (Junho de 2013): 1717–29.
- Martin, Christa Lese, e Dorothy Warburton. «Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 16 (2015): 309–26. doi:10.1146/annurev-genom-090413-025346.
- Masson, Emmanuelle, Cédric Le Maréchal, Richard Delcenserie, Jian-Min Chen, e Claude Férec. «Hereditary Pancreatitis Caused by a Double Gain-of-Function Trypsinogen Mutation». *Human Genetics* 123, n. 5 (Junho de 2008): 521–29. doi:10.1007/s00439-008-0508-6.
- Maulik, Pallab K., Maya N. Mascarenhas, Colin D. Mathers, Tarun Dua, e Shekhar Saxena. «Prevalence of Intellectual Disability: A Meta-Analysis of Population-Based Studies». *Research in Developmental Disabilities* 32, n. 2 (Abril de 2011): 419–36. doi:10.1016/j.ridd.2010.12.018.
- McCarroll, Steven A., e David M. Altshuler. «Copy-Number Variation and Association Studies of Human Disease». *Nature Genetics* 39, n. 7 Suppl (Julho de 2007): S37-42. doi:10.1038/ng2080.
- McNeil, N., e T. Ried. «Novel Molecular Cytogenetic Techniques for Identifying Complex Chromosomal Rearrangements: Technology and Applications in Molecular Medicine».

- Expert Reviews in Molecular Medicine* 2000 (14 de Setembro de 2000): 1–14. doi:doi:10.1017/S1462399400001940.
- McQuillan, Ruth, Anne-Louise Leutenegger, Rehab Abdel-Rahman, Christopher S. Franklin, Marijana Pericic, Lovorka Barac-Lauc, Nina Smolej-Narancic, et al. "Runs of Homozygosity in European Populations". *American Journal of Human Genetics* 83, n° 3 (setembro de 2008): 359–72. doi:10.1016/j.ajhg.2008.08.007.
- Menten, B., N. Maas, B. Thienpont, K. Buysse, J. Vandesompele, C. Melotte, T. de Ravel, et al. "Emerging Patterns of Cryptic Chromosomal Imbalance in Patients with Idiopathic Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies: A New Series of 140 Patients and Review of Published Reports". *Journal of Medical Genetics* 43, n° 8 (agosto de 2006): 625–33. doi:10.1136/jmg.2005.039453.
- Merikangas, Alison K., Aiden P. Corvin, e Louise Gallagher. «Copy-Number Variants in Neurodevelopmental Disorders: Promises and Challenges». *Trends in Genetics: TIG* 25, n. 12 (Dezembro de 2009): 536–44. doi:10.1016/j.tig.2009.10.006.
- Meyer, B. F. «Strategies for the Prevention of Hereditary Diseases in a Highly Consanguineous Population». *Annals of Human Biology* 32, n. 2 (Abril de 2005): 174–79. doi:10.1080/03014460500075217.
- Miclea, Diana, Loredana Peca, Zina Cuzmici, e Ioan Victor Pop. «Genetic Testing in Patients with Global Developmental Delay / Intellectual Disabilities. A Review». *Clujul Medical (1957)* 88, n. 3 (2015): 288–92. doi:10.15386/cjmed-461.
- Miller, David T., Margaret P. Adam, Swaroop Aradhya, Leslie G. Biesecker, Arthur R. Brothman, Nigel P. Carter, Deanna M. Church, et al. «Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies». *American Journal of Human Genetics* 86, n. 5 (14 de Maio de 2010): 749–64. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
- Modell, Bernadette, e Aamra Darr. «Science and Society: Genetic Counselling and Customary Consanguineous Marriage». *Nature Reviews. Genetics* 3, n. 3 (Março de 2002): 225–29. doi:10.1038/nrg754.
- Moeschler, John B., Michael Shevell, e Committee on Genetics. «Comprehensive Evaluation of the Child with Intellectual Disability or Global Developmental Delays». *Pediatrics* 134, n. 3 (Setembro de 2014): e903-918. doi:10.1542/peds.2014-1839.
- Mohamed, A. N., S. A. Ebrahim, R. Aatre, F. Qureshi, S. M. Jacques, e M. I. Evans. «Prenatal Diagnosis of a de Novo Ring Chromosome 11». *American Journal of Medical Genetics* 102, n. 4 (1 de Setembro de 2001): 368–71.
- Moog, Ute. «The Outcome of Diagnostic Studies on the Etiology of Mental Retardation: Considerations on the Classification of the Causes». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 137, n. 2 (30 de Agosto de 2005): 228–31. doi:10.1002/ajmg.a.30841.
- Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips, e D. A. Hungerford. «Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood». *Experimental Cell Research* 20 (Setembro de 1960): 613–16.
- Moreno-Igoa, María, Blanca Hernández-Charro, Amaya Bengoa-Alonso, Aranzazu Pérez-Juana-del-Casal, Carlos Romero-Ibarra, Beatriz Nieva-Echebarria, e María Antonia Ramos-Arroyo. «KANS1 Gene Disruption Associated with the Full Clinical Spectrum of 17q21.31 Microdeletion Syndrome». *BMC Medical Genetics* 16 (22 de Agosto de 2015): 68. doi:10.1186/s12881-015-0211-0.
- Morrow, Eric M. «Genomic Copy Number Variation in Disorders of Cognitive Development». *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 49, n. 11 (Novembro de 2010): 1091–1104. doi:10.1016/j.jaac.2010.08.009.
- Nevado, Julián, Rafaella Mergener, María Palomares-Bralo, Karen Regina Souza, Elena Vallespín, Rocío Mena, Víctor Martínez-Glez, et al. «New Microdeletion and Microduplication Syndromes: A Comprehensive Review». *Genetics and Molecular Biology* 37, n. 1 Suppl (Março de 2014): 210–19.
- Newbury, D. F., e A. P. Monaco. «Genetic Advances in the Study of Speech and Language Disorders». *Neuron* 68, n. 2 (21 de Outubro de 2010): 309–20. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.001.

- Newbury, Dianne F., Laura Winchester, Laura Addis, Silvia Paracchini, Lyn-Louise Buckingham, Ann Clark, Wendy Cohen, et al. «CMIP and ATP2C2 Modulate Phonological Short-Term Memory in Language Impairment». *American Journal of Human Genetics* 85, n. 2 (Agosto de 2009): 264–72. doi:10.1016/j.ajhg.2009.07.004.
- Niklasson, Lena, Peder Rasmussen, Sólveig Oskarsdóttir, e Christopher Gillberg. «Autism, ADHD, Mental Retardation and Behavior Problems in 100 Individuals with 22q11 Deletion Syndrome». *Research in Developmental Disabilities* 30, n. 4 (Agosto de 2009): 763–73. doi:10.1016/j.ridd.2008.10.007.
- Nowell, P., e D. Hungerford. «A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia». *Science* 132 (1947): 1497.
- Odak, Ljubica, Ingeborg Barisić, Leona Morozin Pohovski, Mariluce Riegel, e Albert Schinzel. «Novel Duplication on Chromosome 16 (q12.1-q21) Associated with Behavioral Disorder, Mild Cognitive Impairment, Speech Delay, and Dysmorphic Features: Case Report». *Croatian Medical Journal* 52, n. 3 (Junho de 2011): 415–22.
- Oskarsdóttir, Sólveig, Christina Persson, Bengt O. Eriksson, e Anders Fasth. «Presenting Phenotype in 100 Children with the 22q11 Deletion Syndrome». *European Journal of Pediatrics* 164, n. 3 (Março de 2005): 146–53. doi:10.1007/s00431-004-1577-8.
- Pani, Ariel M., Holly H. Hobart, Colleen A. Morris, Carolyn B. Mervis, Patricia Bray-Ward, Kendra W. Kimberley, Cecilia M. Rios, et al. «Genome Rearrangements Detected by SNP Microarrays in Individuals with Intellectual Disability Referred with Possible Williams Syndrome». *PloS One* 5, n. 8 (2010): e12349. doi:10.1371/journal.pone.0012349.
- Papenhausen, Peter, Stuart Schwartz, Hiba Risheg, Elisabeth Keitges, Inder Gadi, Rachel D. Burnside, Vikram Jaswaney, et al. «UPD Detection Using Homozygosity Profiling with a SNP Genotyping Microarray». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A, n.º 4 (abril de 2011): 757–68. doi:10.1002/ajmg.a.33939.
- Park, Hansoo, Jong-Il Kim, Young Seok Ju, Omer Gokcumen, Ryan E. Mills, Sheehyun Kim, Seungbok Lee, et al. «Discovery of Common Asian Copy Number Variants Using Integrated High-Resolution Array CGH and Massively Parallel DNA Sequencing». *Nature Genetics* 42, n. 5 (Maio de 2010): 400–405. doi:10.1038/ng.555.
- Patau, K., D. W. Smith, E. Therman, S. L. Inhorn, e H. P. Wagner. «Multiple Congenital Anomaly Caused by an Extra Autosome». *Lancet (London, England)* 1, n. 7128 (9 de Abril de 1960): 790–93.
- Pereira, Rodrigo Roncato, Irene Plaza Pinto, Lysa Bernardes Minasi, Aldaires Vieira de Melo, Damiana Mirian da Cruz e Cunha, Alex Silva Cruz, Cristiano Luiz Ribeiro, Cláudio Carlos da Silva, Daniela de Melo e Silva, e Aparecido Divino da Cruz. «Screening for Intellectual Disability Using High-Resolution CMA Technology in a Retrospective Cohort from Central Brazil». *PloS One* 9, n. 7 (2015): e103117. doi:10.1371/journal.pone.0103117.
- Pinkel, D., R. Segraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole, D. Kowbel, C. Collins, et al. «High Resolution Analysis of DNA Copy Number Variation Using Comparative Genomic Hybridization to Microarrays». *Nature Genetics* 20, n. 2 (Outubro de 1998): 207–11. doi:10.1038/2524.
- Pinkel, D., T. Straume, e J. W. Gray. «Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, n. 9 (Maio de 1986): 2934–38.
- Polyak, Andrew, Jill A. Rosenfeld, e Santhosh Girirajan. «An Assessment of Sex Bias in Neurodevelopmental Disorders». *Genome Medicine* 7 (27 de agosto de 2015): 94. doi:10.1186/s13073-015-0216-5.
- Pyatt, Robert E., e Caroline Astbury. «Interpretation of Copy Number Alterations Identified through Clinical Microarray-Comparative Genomic Hybridization». *Clinics in Laboratory Medicine* 31, n. 4 (Dezembro de 2011): 565–580, viii. doi:10.1016/j.cl.2011.08.007.
- Qiao, Ying, Eloi Mercier, Jila Dastan, Jane Hurlburt, Barbara McGillivray, Albert E. Chudley, Sandra Farrell, et al. «Copy Number Variants (CNVs) Analysis in a Deeply Phenotyped

- Cohort of Individuals with Intellectual Disability (ID)». *BMC Medical Genetics* 15 (2014): 82. doi:10.1186/1471-2350-15-82.
- Rauch, Anita, Juliane Hoyer, Sabine Guth, Christiane Zweier, Cornelia Kraus, Christian Becker, Martin Zenker, et al. «Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients with Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 140, n. 19 (1 de Outubro de 2006): 2063–74. doi:10.1002/ajmg.a.31416.
- Ravnan, J. B., J. H. Tepperberg, P. Papenhausen, A. N. Lamb, J. Hedrick, D. Eash, D. H. Ledbetter, e C. L. Martin. «Subtelomere FISH Analysis of 11 688 Cases: An Evaluation of the Frequency and Pattern of Subtelomere Rearrangements in Individuals with Developmental Disabilities». *Journal of Medical Genetics* 43, n. 6 (Junho de 2006): 478–89. doi:10.1136/jmg.2005.036350.
- Redon, Richard, Shumpei Ishikawa, Karen R. Fitch, Lars Feuk, George H. Perry, T. Daniel Andrews, Heike Fiegler, et al. «Global Variation in Copy Number in the Human Genome». *Nature* 444, n. 7118 (23 de Novembro de 2006): 444–54. doi:10.1038/nature05329.
- Regan, R., e L. Willatt. «Mental Retardation: Definition, Classification and Etiology» 18 (15 de fevereiro de 2010): 16–30. doi:10.1159/000287593.
- Reiff, Marian, Barbara A. Bernhardt, Surabhi Mulchandani, Danielle Soucier, Diana Cornell, Reed E. Pyeritz, e Nancy B. Spinner. «“What Does It Mean?”: Uncertainties in Understanding Results of Chromosomal Microarray Testing». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 14, n. 2 (Fevereiro de 2012): 250–58. doi:10.1038/gim.2011.52.
- Reinstein, Eyal, Meytal Liberman, Michal Feingold-Zadok, Tamar Tenne, e John M. Graham. «Terminal Microdeletions of 13q34 Chromosome Region in Patients with Intellectual Disability: Delineation of an Emerging New Microdeletion Syndrome». *Molecular Genetics and Metabolism* 118, n. 1 (Maio de 2016): 60–63. doi:10.1016/j.ymgme.2016.03.007.
- Resta, Nicoletta, e Luigi Memo. «Chromosomal Microarray (CMA) Analysis in Infants with Congenital Anomalies: When Is It Really Helpful?» *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 25 Suppl 4 (Outubro de 2012): 124–26. doi:10.3109/14767058.2012.715004.
- Riegel, Mariluce. «Human Molecular Cytogenetics: From Cells to Nucleotides». *Genetics and Molecular Biology* 37, n. 1 Suppl (Março de 2014): 194–209.
- Rodriguez-Revenga, Laia, Montserrat Mila, Carla Rosenberg, Allen Lamb, e Charles Lee. «Structural Variation in the Human Genome: The Impact of Copy Number Variants on Clinical Diagnosis». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 9, n. 9 (Setembro de 2007): 600–606. doi:10.1097/GIM.0b013e318149e1e3.
- Ropers, H. Hilger. «Genetics of Intellectual Disability». *Current Opinion in Genetics & Development* 18, n. 3 (Junho de 2008): 241–50. doi:10.1016/j.gde.2008.07.008.
- Ropers, Hans Hilger. «Genetics of Early Onset Cognitive Impairment». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11 (2010): 161–87. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141640.
- Ropers, Hans-Hilger. «X-Linked Mental Retardation: Many Genes for a Complex Disorder». *Current Opinion in Genetics & Development* 16, n. 3 (Junho de 2006): 260–69. doi:10.1016/j.gde.2006.04.017.
- Rosenberg, C., L. Navajas, D. F. Vagenas, E. Bakker, M. Vainzof, M. R. Passos-Bueno, R. I. Takata, G. J. Van Ommen, M. Zatz, e J. T. Den Dunnen. «Clinical Diagnosis of Heterozygous Dystrophin Gene Deletions by Fluorescence in Situ Hybridization». *Neuromuscular Disorders: NMD* 8, n. 7 (Outubro de 1998): 447–52.
- Rosenberg, C., J. Knijnenburg, E. Bakker, A. M. Vianna-Morgante, W. Sloos, P. A. Otto, M. Kriek, et al. «Array-CGH Detection of Micro Rearrangements in Mentally Retarded

- Individuals: Clinical Significance of Imbalances Present Both in Affected Children and Normal Parents". *Journal of Medical Genetics* 43, n° 2 (fevereiro de 2006): 180–86. doi:10.1136/jmg.2005.032268.
- Rosenfeld, Jill A., e Ankita Patel. "Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies". *Journal of Pediatric Genetics* 6, n° 1 (março de 2017): 42–50. doi:10.1055/s-0036-1584306.
- Rosenfeld, Jill A., Bradley P. Coe, Evan E. Eichler, Howard Cuckle, e Lisa G. Shaffer. «Estimates of Penetrance for Recurrent Pathogenic Copy-Number Variations». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 15, n. 6 (Junho de 2013): 478–81. doi:10.1038/gim.2012.164.
- Rudd, Danielle, Michael Axelsen, Eric A. Epping, Nancy Andreasen, e Thomas Wassink. «Childhood-Onset Schizophrenia Case with 2.2 Mb Deletion at Chromosome 3p12.2-p12.1 and Two Large Chromosomal Abnormalities at 16q22.3-q24.3 and Xq23-q28». *Clinical Case Reports* 3, n. 4 (Abril de 2015): 201–7. doi:10.1002/ccr3.192.
- Saad, Hassan Abu, Salman Elbedour, Eyad Hallaq, Joav Merrick, e Ariel Tenenbaum. «Consanguineous Marriage and Intellectual and Developmental Disabilities among Arab Bedouins Children of the Negev Region in Southern Israel: A Pilot Study». *Frontiers in Public Health* 2 (2014): 3. doi:10.3389/fpubh.2014.00003.
- Sagoo, Gurdeep S., Adam S. Butterworth, Simon Sanderson, Charles Shaw-Smith, Julian P. T. Higgins, e Hilary Burton. «Array CGH in Patients with Learning Disability (Mental Retardation) and Congenital Anomalies: Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 19 Studies and 13,926 Subjects». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 11, n. 3 (Março de 2009): 139–46. doi:10.1097/GIM.0b013e318194ee8f.
- Salvador-Carulla, Luis, e Marco Bertelli. «"Mental Retardation" or "Intellectual Disability": Time for a Conceptual Change». *Psychopathology* 41, n. 1 (2008): 10–16. doi:10.1159/000109950.
- Salvador-Carulla, Luis, Geoffrey M. Reed, Leila M. Vaez-Azizi, Sally-Ann Cooper, Rafael Martinez-Leal, Marco Bertelli, Colleen Adnams, et al. «Intellectual Developmental Disorders: Towards a New Name, Definition and Framework For "mental Retardation/intellectual Disability" in ICD-11». *World Psychiatry: Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 10, n. 3 (Outubro de 2011): 175–80.
- Schaaf, Christian P., Robin P. Goin-Kochel, Kerri P. Nowell, Jill V. Hunter, Kirk A. Aleck, Sarah Cox, Ankita Patel, Carlos A. Bacino, e Marwan Shinawi. «Expanding the Clinical Spectrum of the 16p11.2 Chromosomal Rearrangements: Three Patients with Syringomyelia». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 19, n. 2 (Fevereiro de 2011): 152–56. doi:10.1038/ejhg.2010.168.
- Schaaf, Christian P., Joanna Wiszniewska, e Arthur L. Beaudet. «Copy Number and SNP Arrays in Clinical Diagnostics». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 12 (2011): 25–51. doi:10.1146/annurev-genom-092010-110715.
- Schalock, Robert L., Ruth A. Luckasson, Karrie A. Shogren, Sharon Borthwick-Duffy, Val Bradley, Wil H. E. Buntinx, David L. Coulter, et al. «The Renaming of Mental Retardation: Understanding the Change to the Term Intellectual Disability». *Intellectual and Developmental Disabilities* 45, n. 2 (Abril de 2007): 116–24. doi:10.1352/1934-9556(2007)45[116:TROMRU]2.0.CO;2.
- Schmickel, R. D. «Contiguous Gene Syndromes: A Component of Recognizable Syndromes». *The Journal of Pediatrics* 109, n. 2 (Agosto de 1986): 231–41.
- Sebat, Jonathan, B. Lakshmi, Jennifer Troge, Joan Alexander, Janet Young, Pär Lundin, Susanne Månér, et al. «Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome». *Science (New York, N.Y.)* 305, n. 5683 (23 de Julho de 2004): 525–28. doi:10.1126/science.1098918.
- Shaffer, Lisa G., e Bassem A. Bejjani. «A Cytogeneticist's Perspective on Genomic Microarrays». *Human Reproduction Update* 10, n. 3 (Junho de 2004): 221–26. doi:10.1093/humupd/dmh022.

- Shaffer, Lisa G., Arthur L. Beaudet, Arthur R. Brothman, Betsy Hirsch, Brynn Levy, Christa Lese Martin, James T. Mascarello, Kathleen W. Rao, e Working Group of the Laboratory Quality Assurance Committee of the American College of Medical Genetics. "Microarray Analysis for Constitutional Cytogenetic Abnormalities". *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 9, n° 9 (setembro de 2007): 654–62. doi:10.1097/GIM.0b013e31814ce3d9.
- Shaw-Smith, C., R. Redon, L. Rickman, M. Rio, L. Willatt, H. Fiegler, H. Firth, et al. "Microarray Based Comparative Genomic Hybridisation (Array-CGH) Detects Submicroscopic Chromosomal Deletions and Duplications in Patients with Learning Disability/Mental Retardation and Dysmorphic Features". *Journal of Medical Genetics* 41, n° 4 (abril de 2004): 241–48.
- Shaw-Smith, Charles, Alan M. Pittman, Lionel Willatt, Howard Martin, Lisa Rickman, Susan Gribble, Rebecca Curley, et al. «Microdeletion Encompassing MAPT at Chromosome 17q21.3 Is Associated with Developmental Delay and Learning Disability». *Nature Genetics* 38, n. 9 (Setembro de 2006): 1032–37. doi:10.1038/ng1858.
- Shevell, M., S. Ashwal, D. Donley, J. Flint, M. Gingold, D. Hirtz, A. Majnemer, et al. «Practice Parameter: Evaluation of the Child with Global Developmental Delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society». *Neurology* 60, n. 3 (11 de Fevereiro de 2003): 367–80.
- Shin, Saeam, Nae Yu, Jong Rak Choi, Seri Jeong, e Kyung A. Lee. «Routine Chromosomal Microarray Analysis Is Necessary in Korean Patients with Unexplained Developmental Delay/mental Retardation/autism Spectrum Disorder». *Annals of Laboratory Medicine* 35, n. 5 (Setembro de 2015): 510–18. doi:10.3343/alm.2015.35.5.510.
- Silva, Amanda G., Ana C. V. Krepschi, Peter L. Pearson, Pierre Hainaut, Carla Rosenberg, e Maria Isabel Achatz. «The Profile and Contribution of Rare Germline Copy Number Variants to Cancer Risk in Li-Fraumeni Patients Negative for TP53 Mutations». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (28 de Abril de 2014): 63. doi:10.1186/1750-1172-9-63.
- Slager, Rebecca E., Tiffany Lynn Newton, Christopher N. Vlangos, Brenda Finucane, e Sarah H. Elsea. «Mutations in RAI1 Associated with Smith-Magenis Syndrome». *Nature Genetics* 33, n. 4 (Abril de 2003): 466–68. doi:10.1038/ng1126.
- Slavotinek, Anne M. «Novel Microdeletion Syndromes Detected by Chromosome Microarrays». *Human Genetics* 124, n. 1 (Agosto de 2008): 1–17. doi:10.1007/s00439-008-0513-9.
- Smeets, Dominique F. C. M. «Historical Prospective of Human Cytogenetics: From Microscope to Microarray». *Clinical Biochemistry* 37, n. 6 (Junho de 2004): 439–46. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.03.006.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Döhner, T. Cremer, e P. Lichter. «Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances». *Genes, Chromosomes & Cancer* 20, n. 4 (Dezembro de 1997): 399–407.
- Srivastava, Anand K., e Charles E. Schwartz. «Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders: Causal Genes and Molecular Mechanisms». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46 Pt 2 (Outubro de 2014): 161–74. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.02.015.
- Srour, Myriam, e Michael Shevell. «Genetics and the Investigation of Developmental Delay/intellectual Disability». *Archives of Disease in Childhood* 99, n. 4 (Abril de 2014): 386–89. doi:10.1136/archdischild-2013-304063.
- Stankiewicz, P., I. Brozek, Z. Hélias-Rodzewicz, J. Wierzbza, J. Pilch, E. Bocian, A. Balcerska, et al. «Clinical and Molecular-Cytogenetic Studies in Seven Patients with Ring Chromosome 18». *American Journal of Medical Genetics* 101, n. 3 (1 de Julho de 2001): 226–39.

- Swillen, Ann, e Donna McDonald-McGinn. «Developmental Trajectories in 22q11.2 Deletion». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 169, n. 2 (Junho de 2015): 172–81. doi:10.1002/ajmg.c.31435.
- Szabó, Gabriella P., Alida C. Knegt, Anikó Ujfalusi, Erzsébet Balogh, Tamás Szabó, e Éva Oláh. «Subtelomeric 6.7 Mb Trisomy 10p and 5.6 Mb Monosomy 21q Detected by FISH and Array-CGH in Three Related Patients». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158A, n. 4 (Abril de 2012): 869–76. doi:10.1002/ajmg.a.35236.
- Tjio, Joe Hin, e Albert Levan. «The Chromosome Number of Man». *Hereditas* 42, n.º 1–2 (1.º de maio de 1956): 1–6. doi:10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x.
- Topper, S., C. Ober, e Soma Das. «Exome Sequencing and the Genetics of Intellectual Disability». *Clinical Genetics* 80, n. 2 (Agosto de 2011): 117–26. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01720.x.
- Trask, Barbara J. «Human Cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 Years and Counting». *Nature Reviews. Genetics* 3, n. 10 (Outubro de 2002): 769–78. doi:10.1038/nrg905.
- Tsuchiya, Karen D., Lisa G. Shaffer, Swaroop Aradhya, Julie M. Gastier-Foster, Ankita Patel, M. Katharine Rudd, Julie Sanford Biggerstaff, et al. «Variability in Interpreting and Reporting Copy Number Changes Detected by Array-Based Technology in Clinical Laboratories». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 11, n. 12 (Dezembro de 2009): 866–73. doi:10.1097/GIM.0b013e3181c0c3b0
- Tucker, Tracy, Sylvie Giroux, Valérie Clément, Sylvie Langlois, Jan M. Friedman, e François Rousseau. «Prevalence of Selected Genomic Deletions and Duplications in a French-Canadian Population-Based Sample of Newborns». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 1, n. 2 (Julho de 2013): 87–97. doi:10.1002/mgg3.12.
- Turleau, Catherine. «Monosomy 18p». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3 (19 de Fevereiro de 2008): 4. doi:10.1186/1750-1172-3-4.
- Uehara, Daniela Tiaki, Shin Hayashi, Nobuhiko Okamoto, Seiji Mizuno, Yasutsugu Chinen, Rika Kosaki, Tomoki Kosho, et al. «SNP Array Screening of Cryptic Genomic Imbalances in 450 Japanese Subjects with Intellectual Disability and Multiple Congenital Anomalies Previously Negative for Large Rearrangements». *Journal of Human Genetics* 61, n. 4 (Abril de 2016): 335–43. doi:10.1038/jhg.2015.154.
- Uttine, G. Eda, Göknur Haliloğlu, Bilge Volkan-Salancı, Arda Çetinkaya, Pelin Ö Kiper, Yasemin Alanay, Dilek Aktaş, et al. «Etiological Yield of SNP Microarrays in Idiopathic Intellectual Disability». *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society* 18, n. 3 (Maio de 2014): 327–37. doi:10.1016/j.ejpn.2014.01.004.
- Karnebeek, Clara D. M. van, Maaïke C. E. Jansweijer, Arnold G. E. Leenders, Martin Offringa, e Raoul C. M. Hennekam. «Diagnostic Investigations in Individuals with Mental Retardation: A Systematic Literature Review of Their Usefulness». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 13, n.º 1 (janeiro de 2005): 6–25. doi:10.1038/sj.ejhg.5201279.
- Veltman, Joris A., Eric F. P. M. Schoenmakers, Bert H. Eussen, Irene Janssen, Gerard Merkx, Brigitte van Cleef, Conny M. van Ravenswaaij, Han G. Brunner, Dominique Smeets, e Ad Geurts van Kessel. «High-Throughput Analysis of Subtelomeric Chromosome Rearrangements by Use of Array-Based Comparative Genomic Hybridization». *American Journal of Human Genetics* 70, n. 5 (Maio de 2002): 1269–76. doi:10.1086/340426.
- Vilboux, Thierry, Carla Ciccone, Jan K. Blacato, Gerald F. Cox, Charu Deshpande, Wendy J. Inthorn, William A. Gahl, Ann C. M. Smith, e Marjan Huizing. «Molecular Analysis of the Retinoic Acid Induced 1 Gene (RAI1) in Patients with Suspected Smith-Magenis Syndrome without the 17p11.2 Deletion». *PloS One* 6, n. 8 (2011): e22861. doi:10.1371/journal.pone.0022861.
- Visser, Lisenka E. L. M., Christian Gilissen, e Joris A. Veltman. «Genetic Studies in Intellectual Disability and Related Disorders». *Nature Reviews. Genetics* 17, n. 1 (Janeiro de 2016): 9–18. doi:10.1038/nrg3999.

- Walters, R. G., S. Jacquemont, A. Valsesia, A. J. de Smith, D. Martinet, J. Andersson, M. Falchi, et al. «A New Highly Penetrant Form of Obesity due to Deletions on Chromosome 16p11.2». *Nature* 463, n. 7281 (4 de Fevereiro de 2010): 671–75. doi:10.1038/nature08727.
- Wang, Binbin, Taoyun Ji, Xueya Zhou, Jing Wang, Xi Wang, Jingmin Wang, Dingliang Zhu, et al. «CNV Analysis in Chinese Children of Mental Retardation Highlights a Sex Differentiation in Parental Contribution to de Novo and Inherited Mutational Burdens». *Scientific Reports* 6 (3 de junho de 2016): 25954. doi:10.1038/srep25954.
- Wang, D. G., J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, et al. «Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome». *Science (New York, N.Y.)* 280, n° 5366 (15 de maio de 1998): 1077–82.
- Wang, Jia-Chi, Leslie Ross, Loretta W. Mahon, Renius Owen, Morteza Hemmat, Boris T. Wang, Mohammed El Naggar, et al. «Regions of Homozygosity Identified by Oligonucleotide SNP Arrays: Evaluating the Incidence and Clinical Utility». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 23, n. 5 (Maio de 2015): 663–71. doi:10.1038/ejhg.2014.153.
- Watson, Corey T., Tomas Marques-Bonet, Andrew J. Sharp, e Heather C. Mefford. «The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 15 (2014): 215–44. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153408.
- Weddell, James A., Brian J. Sanders, e James E. Jones. «CHAPTER 23 - Dental Problems of Children with Special Health Care Needs». In *McDonald and Avery Dentistry for the Child and Adolescent (Ninth Edition)*, organizado por Jeffrey A. Dean, David R. Avery, e Ralph E. McDonald, 460–86. Saint Louis: Mosby, 2011. doi:10.1016/B978-0-323-05724-0.50027-8.
- Weise, Anja, Kristin Mrasek, Elisabeth Klein, Milene Mulatinho, Juan C. Llerena, David Hardekopf, Sona Pekova, Samarth Bhatt, Nadezda Kosyakova, e Thomas Liehr. «Microdeletion and Microduplication Syndromes». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 60, n. 5 (Maio de 2012): 346–58. doi:10.1369/0022155412440001
- Wellcome Trust Case Control Consortium, Nick Craddock, Matthew E. Hurles, Niall Cardin, Richard D. Pearson, Vincent Plagnol, Samuel Robson, et al. «Genome-Wide Association Study of CNVs in 16,000 Cases of Eight Common Diseases and 3,000 Shared Controls». *Nature* 464, n. 7289 (1 de Abril de 2010): 713–20. doi:10.1038/nature08979.
- Weller, Mathias, Marina Tanieri, Josecleide Calixto Pereira, Ednno Dos Santos Almeida, Fernando Kok, e Silvana Santos. «Consanguineous Unions and the Burden of Disability: A Population-Based Study in Communities of Northeastern Brazil». *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council* 24, n. 6 (Dezembro de 2012): 835–40. doi:10.1002/ajhb.22328.
- Wester, Ulrika, Marie-Louise Bondeson, Christina Edeby, e Göran Annerén. «Clinical and Molecular Characterization of Individuals with 18p Deletion: A Genotype-Phenotype Correlation». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 140, n. 11 (1 de Junho de 2006): 1164–71. doi:10.1002/ajmg.a.31260.
- Westerfield, Lauren, Sandra Darilek, e Ignatia B. van den Veyver. «Counseling Challenges with Variants of Uncertain Significance and Incidental Findings in Prenatal Genetic Screening and Diagnosis». *Journal of Clinical Medicine* 3, n. 3 (12 de Setembro de 2014): 1018–32. doi:10.3390/jcm3031018
- Whibley, Annabel C., Vincent Plagnol, Patrick S. Tarpey, Fatima Abidi, Tod Fullston, Maja K. Choma, Catherine A. Boucher, et al. «Fine-Scale Survey of X Chromosome Copy Number Variants and Indels Underlying Intellectual Disability». *American Journal of Human Genetics* 87, n. 2 (13 de Agosto de 2010): 173–88. doi:10.1016/j.ajhg.2010.06.017.

- Willemsen, M. H., e T. Kleefstra. «Making Headway with Genetic Diagnostics of Intellectual Disabilities». *Clinical Genetics* 85, n. 2 (Fevereiro de 2014): 101–10. doi:10.1111/cge.12244.
- Wu, Ye, Taoyun Ji, Jingmin Wang, Jing Xiao, Huifang Wang, Jie Li, Zhijie Gao, et al. «Submicroscopic Subtelomeric Aberrations in Chinese Patients with Unexplained Developmental Delay/mental Retardation». *BMC Medical Genetics* 11 (2010): 72. doi:10.1186/1471-2350-11-72.
- Xu, Jie, e Zhong Chen. «Advances in Molecular Cytogenetics for the Evaluation of Mental Retardation». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 117C, n. 1 (15 de Fevereiro de 2003): 15–24. doi:10.1002/ajmg.c.10016.
- Yunis, J. J. «High Resolution of Human Chromosomes». *Science (New York, N.Y.)* 191, n. 4233 (26 de Março de 1976): 1268–70.
- Zarrei, Mehdi, Jeffrey R. MacDonald, Daniele Merico, e Stephen W. Scherer. «A Copy Number Variation Map of the Human Genome». *Nature Reviews. Genetics* 16, n. 3 (Março de 2015): 172–83. doi:10.1038/nrg3871.
- Zhang, Feng, Wenli Gu, Matthew E. Hurles, e James R. Lupski. «Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10 (2009): 451–81. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164217.
- Zhang, Feng, Pavel Seeman, Pengfei Liu, Marian A. J. Weterman, Claudia Gonzaga-Jauregui, Charles F. Towne, Sat Dev Batish, et al. «Mechanisms for Nonrecurrent Genomic Rearrangements Associated with CMT1A or HNPP: Rare CNVs as a Cause for Missing Heritability». *American Journal of Human Genetics* 86, n. 6 (11 de Junho de 2010): 892–903. doi:10.1016/j.ajhg.2010.05.001.
- Zhang, Ying, Rajini Haraksingh, Fabian Grubert, Alexej Abyzov, Mark Gerstein, Sherman Weissman, e Alexander E. Urban. «Child Development and Structural Variation in the Human Genome». *Child Development* 84, n. 1 (Fevereiro de 2013): 34–48. doi:10.1111/cdev.12051.

SITES UTILIZADOS

- ✓ DECIPHER: < <http://decipher.sanger.ac.uk/>>
- ✓ DGV: < <http://dgv.tcag.ca/>>
- ✓ UCSC genome browser: < <https://genome.ucsc.edu/>>

LISTA DE ANEXOS

I) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

II) FICHA DE ANAMNESE

I) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: USO DE ARRAYS GENÔMICOS DE ALTA RESOLUÇÃO E NGS NO DIAGNÓSTICO DE DEFICIÊNCIA MENTAL E ANOMALIAS CONGENITAS.

PROCESSO FAPESP 2012/50981-5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS

(propósito) está sendo convidado (a) a participar de pesquisa para detectar alterações no DNA.

Através da detecção destas alterações, este projeto visa identificar causas genéticas do quadro clínico apresentado.

O projeto consiste de três etapas:

- 1) Consulta genética e coleta de amostra.
- 2) Detecção de alterações no DNA,
- 3) Devolução dos resultados obtidos às famílias (pessoalmente ou pelo correio).

Eu, _____

responsável pelo propósito, concordo de livre e espontânea vontade em fornecer amostra de sua saliva e/ou sangue para a realização do teste.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas. Entendo que:

- 1) Os testes servirão para possivelmente identificar a causa da doença genética em questão, mas **não há nenhuma certeza** de que a causa será encontrada.
- 2) Esses testes **não** oferecem tratamento terapêutico.
- 3) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação; A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao propósito.
- 4) Os resultados obtidos durante este teste serão mantidos em sigilo.
() **Autorizo** ou () **Não autorizo** a divulgação dos resultados em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.
() **Autorizo** ou () **Não autorizo** a divulgação de fotografias em publicações científicas, desde que dados pessoais sejam mantidos em sigilo.

(☐) **Desejo** ou (☐) **Não desejo** conhecer os resultados desta pesquisa.

- 5) O material coletado será armazenado sob a responsabilidade da empresa **Deoxi Biotecnologia**, sob a guarda da pesquisadora responsável, **Francine Campagnari**, pelo tempo necessário para o estudo.

Assinatura do responsável: _____

Data:

II) FICHA DE ANAMNESE

**Título do projeto: USO DE ARRAYS GENOMICOS DE ALTA RESOLUÇÃO E NGS NO DIAGNÓSTICO
DE DEFICIENCIA MENTAL E ANOMALIAS CONGENITAS**

PROCESSO FAPESP 2012/50981-5

ETIQUETA DE IDENTIFICAÇÃO DO
PACIENTE

FICHA DE ANAMNESE

DATA DA COLETA DE

DADOS: _____

DATA DA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

OCUPAÇÃO: _____

ESCOLARIDADE: _____

GRUPO ÉTNICO: () Branco () Pardo () Negro () Oriental

HISTÓRICO FAMILIAL

CONSANGUINIDADE PARENTAL: () NÃO () SIM

GRAU: _____

NÚMERO DE IRMÃOS: SEXO MASCULINO () SEXO FEMININO ()

OUTROS CASOS SEMELHANTES NA FAMÍLIA: () NÃO () NÃO SABE ()

SIM _____

OUTRAS DOENÇAS NA FAMÍLIA: () NÃO () SIM Qual?

(HEREDOGRAMA ANEXO)

GESTAÇÃO (MÃE)

DIFICULDADES PARA ENGRAVIDAR () NÃO () SIM

ABORTOS? () NÃO () SIM QUANTOS? _____ **(HEREDROGRAMA ANEXO)**

FEZ ACOMPANHAMENTO PRÉ-NATAL? () NÃO () SIM

INTERCORRÊNCIAS DURANTE A GESTAÇÃO: () NÃO () SIM QUAIS?

EXAMES PRÉ-NATAL: () Rubéola () CMV () Toxoplasmose () Sífilis () Herpes () HIV () Não

Sabe () Outros: _____ POSITIVO EM ALGUM DOS TESTES?: () NÃO () SIM EM QUAL?

INFECÇÕES MATERNAS: () NÃO () SIM
QUAL? _____USO DE DROGAS e MEDICAMENTOS: () NÃO () SIM
Quais? _____

USO DE ÁLCOOL? () NÃO () SIM Qual frequência? _____

RAIO-X: () NÃO () SIM

OBSERVAÇÕES: _____

PERÍODO PERINATAL			
INTERCORRÊNCIAS: () NÃO	(	)	SIM

PARTO: () NORMAL	(	) FORCEPS	() CESÁRIA
Motivo: _____			
NASCIMENTO: () TERMO - 37 a 42sem () PRÉ-TERMO - <37sem () PÓS-TERMO - >42sem			
Ao nascer: Peso _____		Comprimento _____	
Boas condições de vitalidade: () NÃO () SIM			
ANOXIA: () NÃO () SIM		CIANOSE: () NÃO () SIM	
ICTERÍCIA: () NÃO () SIM		BANHO DE LUZ: () NÃO () SIM	
INCOMPATIBILIDADE DE Rh () NÃO () SIM – Foi administrado soro Anti-Rh?			

DEFEITOS FÍSICOS:	(	) NÃO	() SIM

INCUBADORA:	(	) NÃO	() SIM
Motivo: _____			
UTI neonatal:	(	) NÃO	() SIM
Motivo: _____			
MAMOU AO NASCER	(	) NÃO	() SIM

SAÍDA DA MATERNIDADE COM A MÃE:	(	) NÃO	
Motivo: _____ () SIM			

DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR E HISTÓRICO CLÍNICO			
BEBÊ: () FIRME () MOLE			
IDADE	QUE	SUSTENTOU	O
PESCOÇO: _____			
IDADE	QUE	SENTOU	COM
APOIO: _____			
IDADE	QUE	SENTOU	SEM
APOIO: _____			
IDADE			QUE
ENGATINHOU: _____			

IDADE	QUE
ANDOU: _____	
—	
FALOU	COM QUANTOS
ANOS? _____	
DISTÚRBIOS DE LINGUAGEM () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
DISTÚRPIO AUDITIVO () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
DISTÚRPIO VISUAL () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
DISTÚRPIO DE MARCHA () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
DISFUNÇÃO MÚSCULO-ESQUELÉTICO () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
DEDOS DAS MÃOS () NORMAL () POLIDACTILIA () SINDACTILIA () MICRODACTILIA	
DEDOS DOS PÉS () NORMAL () POLIDACTILIA () SINDACTILIA () MICRODACTILIA	
PALATO () NORMAL () ALTO () OUTRO	

POSIÇÃO AURICULAR () NORMAL () ALTA ()	
OUTRO _____	
MANCHAS CUTANEAS () NÃO () SIM DE QUE TIPO? _____ QUANTAS?	

ANOMALIA NA GENITÁLIA () NÃO () SIM DE QUE	
TIPO? _____	
MENARCA () NÃO () SIM IDADE _____ N/A ()	
CONVULSÕES () NÃO () SIM	
FREQUENCIA: _____	
LE E ESCRIVE () NÃO () SIM	

DIFICULDADES NA ESCOLA () NÃO () SIM QUAIS?	

HIPERATIVIDADE () NÃO () SIM	

FALTA DE ATENÇÃO () NÃO () SIM

REGIDEZ/TREMORES () NÃO () SIM

CEFALÉIA () NÃO () SIM

FREQUENCIA:_____

DISTÚRBIOS DE COMPORTAMENTO () NÃO () SIM

CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS MARCANTES OU RELEVANTES:

MEDICAMENTOS

UTILIZADOS:

DIABETES MELITO: () NÃO ()

SIM_____

MENINGITE/MENINGOENCEFALITES: () NÃO ()

SIM_____

OUTRAS DOENÇAS: () NÃO () SIM

OBS.:_____

INTERNAÇÕES: () NÃO () SIM

OBS.:_____

CIRURGIAS: () NÃO () SIM

OBS.: _____

FEZ CARIÓTIPO? () NÃO () SIM onde?

OUTRAS OBSERVAÇÕES

RELEVANTES: _____

INFORMAÇÕES PARA ACONSELHAMENTO GENÉTICO

PAIS OU IRMÃOS EM IDADE REPRODUTIVA QUE PRETENDEM TER FILHOS: () NÃO () SIM

HEREDROGRAMA