Bruna Lucheze Freire

Sequenciamento paralelo em larga escala de genes alvo é uma ferramenta útil no diagnóstico etiológico de crianças nascidas pequenas para idade gestacional

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

**São Paulo
2018**

Bruna Lucheze Freire

Sequenciamento paralelo em larga escala de genes alvo é uma ferramenta útil no diagnóstico etiológico de crianças nascidas pequenas para idade gestacional

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Freire, Bruna Lucheze

Sequenciamento paralelo em larga escala de genes
alvo é uma ferramenta útil no diagnóstico etiológico
de crianças nascidas pequenas para idade gestacional
/ Bruna Lucheze Freire. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Retardo do crescimento
fetal/genética 2.Insuficiência de
crescimento/genética 3.Sequenciamento de
nucleotídeos em larga escala 4.Mutação/genética
5.Fator de crescimento insulin-like I/genética
6.Receptor IGF tipo 1/genética

USP/FM/DBD-101/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, aos meus pais e irmão por todo o apoio desde a decisão de fazer biologia, até a realização do mestrado, me oferecendo todo o suporte e tranquilidade necessários para eu alcançar meu objetivo.

Agradeço a minha tia Shirley, e meu primo Breno, que tem síndrome de Noonan e é acompanhado pelo grupo do HC, por meio do qual conheci o meu orientador Dr. Alexander, quando os acompanhei em uma consulta, e surgiu a oportunidade de realizar o mestrado com a sua orientação.

Agradeço também todos os familiares que me apoiaram em todos esses momentos.

Agradeço muito ao meu orientador Alexander pela oportunidade oferecida e pelo trabalho realizado como orientador com todo o suporte para que eu evoluísse como pesquisadora e pessoa durante esses anos. O ciclo não acaba aqui, teremos mais alguns anos de parceria durante o doutorado.

Agradeço todos os colegas de trabalho que me ajudaram e me ensinaram no laboratório durante esses anos, especialmente a Mariana, parceira de bancada nos experimentos realizados, e a Thais por toda ajuda com a caracterização clínica dos pacientes. Agradeço também a Dra. Miriam por todo o ensinamento me passado e a Amanda e ao SELA pelo apoio no sequenciamento. Assim como todo pessoal do LIM 42, LIM 25 e do SELA, que

foram os laboratórios envolvidos no projeto. E ao Dr. Antônio Lerário, responsável por toda a parte de bioinformática do projeto.

Sou grata as agências de fomento, Fapesp e Capes, pelo apoio financeiro oferecido para que o projeto fosse desenvolvido.

Agora agradeço à família que eu escolhi para vida, meus amigos, que estão juntos comigo desde o começo da faculdade, à formação da melhor república de Barão Geraldo e que hoje seguem caminhos diferentes, porém sempre apoiando uns aos outros. E mesmo estando um em cada lugar, não passa um dia que não nos falamos por whatsapp no grupo da república. Um obrigado imenso por fazerem parte da minha vida e que a gente siga o plano de juntar todo mundo pelo menos para comemorar o ano novo tradicional da KXT. Obrigada, Barbe, Chicken, Messi, Chip, Paulista, Mococa, Buh, Ingrid, Rebelde, Nay, Mah, Bagas, Pushpop, pela amizade e apoio incondicional, quero vocês para sempre presentes.

Agradeço também às queridas amigas de colégio, Dani, Ana, Ju e Carol, por estarem ao meu lado durante tanto tempo.

SUMÁRIO

Lista de siglas	
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Investigação genético-molecular dos distúrbios do crescimento	02
1.2 Sequenciamento Paralelo em Larga escala	04
1.3 Processo de crescimento e sua regulação	06
1.4 Condições genéticas associadas a crianças nascidas pequenas para idade gestacional	07
1.4.1 Defeitos nos genes do sistema IGFs/IGF1R	07
1.4.2 Defeitos em vias de sinalização intracelular	09
1.4.3 Defeitos em processos celulares fundamentais	10
1.4.4 Defeitos em fatores parácrinos que regulam a cartilagem de crescimento	10
1.4.5 Defeitos em componentes da matriz extracelular da cartilagem de crescimento	11
1.4.6 Síndrome dos genes contíguos	12
1.4.7 Defeitos de <i>imprinting</i>	12
1.5 Sequenciamento paralelo em Larga Escala para investigação de baixa estatura	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Principal	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Considerações éticas	19
3.2 Casuística	19
3.3 Estudos Moleculares	21

3.3.1. Extração do DNA genômico	21
3.3.2 Genotipagem por sequenciamento paralelo em larga escala	22
3.4 Análise de resultados	27
3.4.1 Bioinformática	27
3.4.2 Sequenciamento Automático Tradicional	36
3.4.3 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Caracterização dos pacientes selecionados para o estudo ..	39
4.2 Resultados do painel Sure SelectXT da Agilent	40
4.2.1 Métricas do sequenciamento	40
4.3 Análise global das variantes de interesse encontradas	42
4.4 Análise das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas	48
4.4.1 Variantes em genes no sistema IGFs/IGF1R	48
4.4.2 Variantes em genes da via RAS/MAPK	50
4.4.3 Variantes em genes participantes de processos celulares fundamentais	55
4.4.4 Variantes em fatores parácrinos que regulam a cartilagem de crescimento	64
4.4.5 Síndrome dos genes contíguos	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	78
7 ANEXOS	80
Anexo A - Tabela contendo todos os genes incluídos no painel Sure Select para sequenciamento dos genes alvo em crianças nascidas PIG, sem recuperação espontânea de crescimento na vida pós-natal.....	81
Anexo B - Protocolo para avaliação clínica de paciente nascido pequeno para idade gestacional.....	82
Anexo C - Caracterização fenotípica dos pacientes nascidos pequeno para idade gestacional com distúrbios, que foram classificados como sindrômicos.....	84

Anexo D - Resumo das linhas de evidência utilizadas na classificação pelo guia ACMG-AMP.....	87
Anexo E - Critérios utilizados para classificação final de patogenicidade segundo o guia ACMG-AMP.....	88
Anexo F - Tabela completa da casuística selecionada, com as características observadas e mensuradas em avaliação clínica. Endereço eletrônico: DOI: 10.13140/RG.2.2.16883.22565	89
Anexo G - Variantes classificadas como de significado incerto.	90
8 REFERÊNCIAS	91

LISTA DE SIGLAS

ACMG-AMP	<i>American College of Medical Genetics and Genomics and Association for Molecular Pathology</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

B	Benign/ Benigna
BA1	<i>Benign stand alone</i>
BS1	<i>Benign Strong 1</i>
CGHa	<i>Comparative Genomic Hybridization Array</i>
CN	Comprimento ao Nascimento
CNV	<i>Copy Number Variantion</i>
CONTRA	<i>COpy Number Targeted Resequencing Analysis</i>
ddNPPs	Didesoxirribonucleotídeos
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNPM	Desenvolvimento Neuro Psico Motor
F	Feminino
FISH	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
IGV	<i>Intregative Genome Viewer</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
LB	<i>Likely Benign/</i> Provavelmente benigna
LOF	<i>Loss of Function</i>
LP	<i>Likely Pathogenic/</i> Provavelmente Patogênica
M	Masculino
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	<i>Pathogenic/ Patogênica</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
pLI	Probabilidade de intolerância a variantes perda de função
PM2	<i>Pathogenic Moderate 2</i>
PN	Peso ao Nascimento
PP2	<i>Pathogenic Supporting 2</i>

PP3	<i>Pathogenic Supporting 3</i>
PP4	<i>Pathogenic Supporting 4</i>
PS1	<i>Pathogenic Strong 1</i>
PS3	<i>Pathogenic Strong 3</i>
PVS1	<i>Pathogenic Very Strong 1</i>
RCIU	Retardo de Crescimento Intrauterino
rhGH	<i>Recombinant Human Growth Hormone</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SBL	Sequenciamento por ligação
SBS	Sequenciamento por síntese
SC	Síndrome de Costelo
SCS	Síndrome de Coffin-Síris
SGA	<i>Small for gestational age</i>
SL	Síndrome de Leopard
SN	Síndrome de Noonan
SNVs	<i>Single Nucleotide Variants</i>
TORSCH	toxoplasma, vírus da rubéola, sífilis, citomegalovírus e herpes vírus
VCF	<i>Variant Call Format</i>
VUS	<i>Variant of Unknown Significance</i> / Variante de significado incerto
Z	escore-Z

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
g	grama
Gb	gigabase
kg	quilograma
Mb	megabase
mL	mililitro
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanometro
pb	<i>base pair</i>
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
X	vezes
%	por cento
~	aproximadamente
<	menor
>	maior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo da seleção da casuística e estratégia para o estudo de crianças nascidas pequenas para idade gestacional. O sequenciamento alvo de genes candidatos será realizado utilizando a plataforma NextSeq da Illumina	21
Figura 2	Esquema das principais etapas do sequenciamento paralelo em larga escala. 1. Primeiramente ocorre a fragmentação do material genômico e a ligação a adaptadores. 2. Hibridação com sondas de biotina e captura dos genes alvos com beads de estreptavidina. 3. Ligação dos adaptadores a pequenas sequências que ficam em uma placa denominada flowcell, onde ocorre a amplificação clonal. 4. Ocorre o sequenciamento propriamente dito, que no caso é feito por síntese através de uma DNA polimerase, cada nucleotídeo adicionado emite um fluoróforo específico	23
Figura 3	Fluxo da estratégia de filtragem utilizada para selecionar as variantes com possibilidade de patogenicidade em 80 pacientes PIG submetidos ao sequenciamento de genes alvos pelo painel Sure Select	30
Figura 4	Exemplo da visualização de uma variante não sinônima (acima) e uma deleção (abaixo) no programa IGV (Integrative Genomics Viewer)	34
Figura 5	Exemplo da visualização do gráfico gerado pelo programa CONTRA. Podemos observar uma deleção no gene <i>GHR</i> (X indicado pela seta). Esta deleção (Exon 3 do gene) é um polimorfismo existente na população	36

Figura 6	Visualização do gráfico gerado pelo CONTRA, com a deleção multiexônica em homozigose no <i>BLM</i> (pontos verdes indicados pela seta)	58
Figura 7	Eletroferograma do sequenciamento por Sanger da variante SHOX: c. 503G>A; p.Arg168Gln. Acima DNA controle, abaixo do paciente, seguido por DNA do pai e mãe. Acredita-se que a mãe apresente a variante em mosaicismo, pois quando comparados os eletroferogramas podemos observar uma intensidade diferente dos espectros capturados dos nucleotídeos G e A entre mãe e filho	69
Figura 8	Gráfico gerado pela análise do número de cópias pelo CONTRA, mostrando uma deleção no cromossomo 22 (pontos verdes indicados pela seta)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de classificação de patogenicidade das ferramentas <i>in silico</i> utilizadas nas filtrações da VCF	33
Tabela 2	Caracterização da casuística selecionada para o estudo dos genes alvo até o presente momento	40
Tabela 3	Análise métrica da corrida referente ao painel de genes de distúrbio de crescimento de 96 pacientes analisados utilizando o kit NextSeq 500 v2 mid output	41
Tabela 4	Variantes encontradas nas 3 corridas separadamente ao longo da filtração, assim como as variantes selecionadas para segregação em familiares	42
Tabela 5	Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas encontradas no sequenciamento de genes alvo em crianças nascidas FIG. Número referência da variante no dbSNP, tipo de herança, fenótipos associados e classificação de patogenicidade de acordo com o guia da ACMG-AMP	44
Tabela 6	Diagnóstico genético obtido por sequenciamento paralelo em larga escala através de um painel de genes candidatos em pacientes com síndromes reconhecidas clinicamente	46
Tabela 7	Variantes consideradas de significado incerto, porém podem explicar o fenótipo do paciente	49

RESUMO

Freire BL. *Sequenciamento paralelo em larga escala de genes alvo é uma ferramenta útil no diagnóstico de crianças nascidas pequenas para idade gestacional* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As doenças que comprometem o crescimento humano apresentam uma forte influência genética. O objetivo geral do projeto atual é desenvolver e aplicar a tecnologia de sequenciamento paralelo em larga escala para compreensão desses distúrbios de crescimento, com foco principal em crianças nascidas pequenas para idade gestacional (PIG), definida como criança com Escore-Z de comprimento e/ou peso ao nascimento menor ou igual a -2. PIG é uma condição heterogênea, que inclui como causa fatores maternos, placentários e fetal, dentre o qual, destacam-se as alterações genéticas. Crianças nascidas PIG e que não recuperaram seu déficit estatural espontaneamente nos primeiros anos de vida apresentam uma alta probabilidade de serem adultos baixos e costumam evoluir com quadros clínicos complexos, envolvendo retardo de crescimento persistente na vida pós-natal, dismorfismos, anomalias congênitas e distúrbios de desenvolvimento neuropsicomotor. Foi utilizada a tecnologia de sequenciamento Sure Select (Agilent Technologies, CA, USA) para estudar aproximadamente 390 genes escolhidos por pertencerem à via IGFs/IGF1R, principal eixo regulador hormonal do crescimento, genes sabidamente envolvidos em doenças associadas com distúrbio de crescimento, além de genes candidatos identificados em estudos prévios do laboratório, associados à regulação do crescimento, em um grande número de pacientes. Foram sequenciados 80 pacientes, obtendo uma cobertura média de 354 vezes e com mais de 99% da região alvo com cobertura > 10 *reads*. Nestas amostras foram identificadas 58 variantes, 18 consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 19 pacientes, 32 de significado incerto, 7 provavelmente benigna e 1 provavelmente patogênica para condição não associada a distúrbio de crescimento (“achado acidental”). Dentre as variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas houve uma grande heterogeneidade entre os genes, sendo identificadas variantes nos genes *PTPN11* (x3), *BLM* (x3), *NPR2* (x2), *ANKRD11* (x2), *SRCAP* (x2), *FGFR3* (x2), *IGF1R*, *SHOC2*, *SHOX*, *NIPBL* e deleção 22q11. Podemos concluir que a técnica de sequenciamento paralelo em larga escala de genes alvo é eficiente em estabelecer o diagnóstico molecular de crianças nascidas PIG. Foi possível identificar a etiologia genética em 23,75% da casuística estudada, em sua maior parte, de pacientes com síndromes reconhecidas clinicamente. Contudo, defeitos no sistema IGFs/IGF1R não foram frequentes nesta condição.

Descritores: 1.Retardo do crescimento fetal/genética 2.Insuficiência de crescimento/genética 3.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 4.Mutação/genética 5.Fator de crescimento insulín-like I/genética 6.Receptor IGF tipo 1/genética

ABSTRACT

Freire BL. *Targeted gene panel sequencing is a useful technology for the diagnosis of children born small for gestational age* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Diseases affecting human growth are most likely caused by genetic factors. The main goal of this project is to apply the technology of massive parallel sequencing to comprehend growth disturbs in children born small for gestational age (SGA), known as the children with Z-score of height and/or weight at birth less or equal -2. SGA is a heterogeneous condition, and as its causes we can find maternal, placental and fetal factors, of which, the most important are the genetic alterations. Children born SGA that do not have catch-up growth spontaneously up to the second year of life may remain with short stature when adults and they usually present other clinical features, such as dimorphisms, congenital anomalies and neuropsychomotor developmental delay. We used the Sure Select technology (Agilent Technologies, CA, USA) to study approximately 390 genes chosen by participate of the IGFs/IGF1R system, or genes already associated with growth disorders, or candidate genes found in previous studies of aCGH (*Array Comparative Genomic Hybridization*) or exome sequencing. We sequenced 80 patients, and had a mean coverage of 354x, with more than 99% of the target region with > 10 reads. We found 58 variants, 18 classified as pathogenic or probably pathogenic in 19 patients, 32 variants of unknown significance and 7 probably benign and 1 probably pathogenic for a condition non associated to short stature (“incidental finding”) Among the probably pathogenic and pathogenic we found a great heterogeneity in genes, with variants identified in 10 different genes *PTPN11* (x3), *BLM* (x3), *NPR2* (x2), *ANKRD11* (x2), *SRCAP* (x2), *FGFR3* (x2), *IGF1R*, *SHOC2*, *SHOX*, *NIPBL* and a 22q11 deletion. In conclusion, the technique of targeted gene panel sequencing is a useful tool to establish the molecular diagnose in children SGA. We could identify the molecular cause in 23.75% of the casuistic, mostly patients with clinically recognized syndromes. However, variants at IGFs/IGF1R system are not frequently associated with the studied condition.

Descriptors: 1.Fetal growth retardation/genetics 2.Failure to thrive /genetics 3.High-throughput nucleotide sequencing 4.Mutation/genetics 5.Insulin-like growth factor I/genetics 6.Receptor, IGF type 1 /genetics.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Investigação genético-molecular dos distúrbios do crescimento

A identificação de defeitos moleculares associados a doenças genéticas sempre foi um grande desafio. Nas décadas de 50 e 60, a descrição do número de cromossomos e do padrão de bandeamento dos mesmos⁽¹⁾, respectivamente, possibilitou as primeiras associações entre alterações cromossômicas e algumas síndromes. Ainda em 1959, a trissomia do cromossomo 21 foi relacionada à síndrome de Down⁽²⁾ e alterações no número de cromossomos sexuais foram associadas às síndromes de Turner e de Klinefelter^(3, 4). A partir de então, inserções, deleções, translocações e outros rearranjos mais complexos começaram a ser descritos e também foram associados a quadro clínicos sindrômicos.

Nas últimas décadas, observamos o desenvolvimento de novas técnicas com resolução crescente na pesquisa de variação no número de cópias de material genômico⁽⁵⁾. Em nosso grupo, diversos estudos foram desenvolvidos utilizando as técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e de amplificação múltipla dependente da ligação de sondas (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA) na investigação de doenças endocrinológicas que comprometem o crescimento⁽⁶⁻⁸⁾.

Na década de 90, foi descrita a técnica de hibridação genômica comparativa (*Comparative Genomic Hybridization* - CGH)⁽⁹⁾. A hibridação de um

DNA teste e um DNA referência, marcados com diferentes fluoró cromos, em cromossomos metafásicos, possibilitou o rastreamento do genoma para detecção de perdas e ganhos de regiões cromossômicas. O aperfeiçoamento desta técnica foi obtido com o desenvolvimento do CGH *arrays* (aCGH), uma metodologia de alta resolução capaz de varrer todo o genoma a procura de variações no número de cópias⁽¹⁰⁾. O rastreamento de alta resolução de todo o genoma, além de detectar aneuploidias, microdeleções e microduplicações previamente descritos, pode também detectar alterações em regiões inéditas, possibilitando a identificação de novos *loci* associados a muitas doenças. Esta evolução no campo da citogenética foi acompanhada pelo avanço das técnicas de biologia molecular. Na década de 70, foi descrito o sequenciamento genômico⁽¹¹⁾ que permitiu analisar a sequência de nucleotídeos dos genes de interesse. A técnica de sequenciamento classicamente utilizada nas últimas quatro décadas é conhecida como técnica de Sanger⁽¹¹⁾ e baseia-se no uso de sequências de nucleotídeos iniciadores, que se anelam a sequência alvo, iniciando o processo de replicação do DNA por ação de uma DNA polimerase. A presença de nucleotídeos modificados, didesoxirribonucleotídeos (ddNPPs), na reação promove a parada aleatória da extensão da fita de DNA em diversos pontos distintos. A técnica de Sanger permite o sequenciamento de 400-800 pares de bases (pb) de uma determinada região alvo em cada reação. O Projeto Genoma Humano utilizou essa metodologia, sendo concluído em abril de 2003, 13 anos após o seu início⁽¹²⁾, envolveu mais de 500 pesquisadores e teve um custo estimado de US\$ 3,8 bilhões. Nestas últimas duas décadas a popularização da técnica de Sanger permitiu a identificação de diversos genes, que quando mutados eram responsáveis por doenças monogênicas. Apesar da

técnica de Sanger ter permitido a introdução do sequenciamento gênico como ferramenta diagnóstica em muitas doenças, a heterogeneidade genética, a falta de regiões *hot spot* e a necessidade de sequenciar extensas regiões em várias condições de origem genética dificultam limitação do número de pares de bases sequenciados, dificultam a implantação desta metodologia na rotina diagnóstica. Por este motivo, recentemente novas metodologias de sequenciamento foram desenvolvidas visando a genotipagem simultânea de diversas regiões do genoma, com maior velocidade e menor custo. Desta forma, seria possível que toda a região genômica de um determinado gene e até mesmo vários genes fossem analisados em uma única reação expandindo as possibilidades de uso das técnicas de sequenciamento para investigação de doenças genéticas e na aplicação desta ferramenta na rotina diagnóstica de diversas doenças conhecidas.

1.2 Sequenciamento Paralelo em Larga escala

As novas tecnologias de sequenciamento enquadram-se no chamado sequenciamento paralelo em larga escala, as quais combinam uma etapa que visa o preparo de bibliotecas de sequências de DNA a serem analisados, o sequenciamento propriamente dito e uma análise de bioinformática para o alinhamento das sequências geradas a um genoma referência e priorização das variantes encontradas. Estes instrumentos permitem uma rápida preparação de amostras antes do sequenciamento, e gera uma grande quantidade de dados com significativa redução de tempo e custo^(13, 14).

No mercado, existem duas abordagens para o sequenciamento paralelo em larga escala que são o sequenciamento por ligação (SBL) e o sequenciamento por síntese (SBS). A primeira utiliza de sondas ligadas a fluoróforos que hibridizam com o DNA e geram uma imagem, a segunda é caracterizada pela utilização de uma DNA polimerase para adição de bases que são capturadas pela imagem/cor ou pela mudança iônica do meio de acordo com a síntese da fita de DNA. As plataformas que utilizam o SBL são, SOLiD (Applied Biosystem, OH, EUA) e Complete Genomics (Beijing Genomics Institute-BGI), já as que utilizam SBS são, as plataformas MiniSeq, HiSeq, MiSeq e NextSeq (Illumina, CA, EUA); Gene Reader (Qiagen, Hilden, GER); Pirosequenciamento 454 (Roche, Branford, CO, EUA) e IonTorrent (Thermo Fischer, MA, EUA)⁽¹⁵⁾.

O sequenciamento paralelo em larga escala, pode ser dividido em; sequenciamento genômico, pelo qual todo o genoma é sequenciado; sequenciamento exômico, onde apenas o que corresponde as regiões codificadoras de proteínas são sequenciadas; e sequenciamento de regiões ou genes selecionados, chamado de sequenciamento alvo⁽¹⁶⁾.

O objetivo do nosso grupo é aplicar esta tecnologia para identificar a etiologia genética de distúrbios de crescimento. A identificação destes genes não visa apenas esclarecer a determinação genética da altura, mas também compreender suas interações com fenótipos complexos como predisposição a câncer, desenvolvimento cognitivo e consequências metabólicas, além de promover aconselhamento genético preciso para o paciente e/ou sua família.

1.3 Processo de crescimento e sua regulação

O crescimento é um processo comum a todos os organismos multicelulares sendo essencial para formação de um indivíduo adulto saudável. Compreende a replicação e diferenciação de células dos diferentes tecidos em um processo dinâmico, não homogêneo e complexo, que envolve a interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais. Nos organismos vertebrados, como nos seres humanos, o crescimento longitudinal é principalmente determinado pelo processo de ossificação endocondral. Neste processo o esqueleto cartilaginoso, formado durante a vida embrionária, é quase totalmente substituído por um esqueleto ósseo. É na cartilagem de crescimento que o tecido cartilaginoso sofre expansão, diferenciação e subsequente substituição pelo tecido ósseo, resultando na formação e crescimento dos ossos longos. O eixo GH/IGF-1 (hormônio de crescimento/ fator de crescimento insulina-símile tipo 1) é o principal regulador hormonal do crescimento na vida pós-natal.

Nas últimas décadas, a genética e a biologia molecular passaram a desempenhar um papel essencial na pesquisa das causas hereditárias de doenças humanas. Na área de crescimento, nosso grupo incorporou exames moleculares como uma extensão natural da investigação laboratorial comum. Nos últimos 20 anos foram mais de 22 genes estudados, muitos incorporados na rotina da investigação diagnóstica dos pacientes, abrangendo genes ligados a defeitos no eixo GH/IGF-1⁽¹⁷⁻²⁴⁾, displasias esqueléticas^(7, 25, 26) ou associados a síndromes genéticas⁽²⁷⁻³¹⁾.

1.4 Condições genéticas associadas a crianças nascidas pequenas para idade gestacional

O retardo de crescimento intrauterino (RCIU) refere-se ao crescimento fetal atenuado. Sua ocorrência resulta frequentemente no nascimento de uma criança pequena para idade gestacional (PIG), definida como aquela com peso e/ou comprimento ao nascimento 2 ou mais desvios-padrão abaixo da média populacional para idade gestacional. A maioria das crianças PIG apresenta recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, com normalização da sua estatura ao redor do segundo ano de vida. Entretanto, 10 a 15% delas evoluem sem esta recuperação e permanecem com baixa estatura pós-natal. As causas desse déficit de crescimento pré-natal, bem como de sua manutenção após o nascimento, ainda não são completamente conhecidas. Porém o desenvolvimento de novas tecnologias para análise de variantes genômicas permitiu um rápido avanço na compreensão de doenças genéticas congênitas, como a baixa estatura, tanto sindrômica como não-sindrômica. Com isso foi possível à associação de diversos defeitos moleculares à baixa estatura de início pré-natal, os quais foram classificados dentro de seis grupos distintos⁽³²⁾.

1.4.1 Defeitos nos genes do sistema *IGFs/IGF1R*

Tem sido proposto que defeitos neste sistema, envolvendo o *IGF-1* e seu receptor *IGF-1R*, sejam um mecanismo de RCIU e de persistência de déficit de crescimento pós-natal. Pacientes com defeitos no gene do *IGF1* foram previamente descritos em raros relatos de caso na literatura⁽³³⁾. Em nosso grupo,

em estudo prévio, avaliamos o *IGF1* em 54 crianças nascidas PIG sem “*catch-up growth*” e não encontramos mutações neste gene, corroborando o conhecimento de que este seria um mecanismo raro de RCIU⁽¹⁸⁾. Adicionalmente, até o momento, uma única mutação inativadora no gene *IGF2*, pertencente à mesma via *IGFs/IGF1R*, foi descrita como causa de retardo de crescimento pré e pós-natal, mimetizando um quadro de síndrome de Silver-Russel⁽³⁴⁾.

Em contraste a raridade dos defeitos nas IGFs, mutações inativadoras e deleções do gene do *IGF1R* em heterozigose vêm sendo relatadas de forma crescente nos últimos dez anos em pacientes com história de déficit de crescimento pré e pós-natal⁽³⁵⁾. É estimado que mutações no gene *IGF1R* sejam encontradas em aproximadamente 3% das crianças nascidas PIG^(32, 36). Um estudo avaliou 100 pacientes PIG, utilizando a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA), e identificou 2 pacientes com deleções que compreendiam o *IGF1R*⁽³⁶⁾. Em nosso grupo avaliamos a presença de mutações e alteração de expressão em um grupo de 25 crianças nascidas PIG, sem recuperação do crescimento na vida pós-natal e com valores séricos de IGF-1 elevados. Identificamos nesta casuística 1 paciente com mutação no *IGF1R* e 5 outros com baixa expressão deste receptor em leucócitos periféricos⁽³⁷⁾. Esta baixa expressão foi confirmada em fibroblastos (em nível de RNA e proteína) e pode ser secundária a alterações intrônicas não avaliadas (dados não publicados). Adicionalmente, publicamos um estudo que avaliou a presença de variações no número de cópias por CGHa em um grupo de crianças nascidas PIG. Neste estudo conseguimos estabelecer a causa genética da baixa

estatura em 13% da casuística estudada, onde foi possível observar alguns CNVs recorrentes à condição estudada, como o rearranjo 15q26, que compreende o gene *IGF1R*, localizado na região 15q26.3⁽³⁸⁾.

1.4.2 Defeitos em vias de sinalização intracelular

Diversas vias de sinalização intracelular exibem um papel importante para o ciclo celular, incluindo a proliferação e diferenciação dos condrócitos da cartilagem de crescimento. Quando desreguladas, essas vias levam a profundas consequências no desenvolvimento⁽³⁹⁾. Como exemplo, temos a via RAS/MAPK, a qual integra sinais de alguns fatores de crescimento, como GH (Hormônio de crescimento), FGFs (Fatores de crescimento de fibroblasto), e EGF (Fator de crescimento epidérmico). A hiperativação de alguns genes que participam desta via, como *PTPN11* (OMIM 176876), *KRAS* (OMIM 190070), *SOS1* (OMIM 182530), *RAF1* (OMIM 164760), *BRAF* (OMIM 164757), *SHOC2* (OMIM 602775), *NRAS* (OMIM 164790), *MEK1* (OMIM 176872) e *CBL* (OMIM 165360) levam a condições denominadas Rasopatias, que incluem as Síndromes de Noonan (SN; OMIM 163950), Síndrome de Leopard (SL; OMIM 151100), dentre outras⁽³²⁾. Síndromes caracterizadas por uma herança autossômica dominante e que tem como principais características fenotípicas a presença de anormalidades congênitas múltiplas, como alterações faciais típicas, baixa estatura, defeito cardíaco congênito, atrasos de DNPM e graus variáveis de deficiência intelectual⁽⁴⁰⁾.

1.4.3 Defeitos em processos celulares fundamentais

Processos celulares fundamentais envolvem reações que permitem o correto funcionamento celular, como transcrição, divisão, sinalização e localização celular, reparo de DNA e regulação de *splicing*. Mutações em genes que participam destes processos fundamentais podem ser responsáveis por deficiências de crescimento tanto pré- quanto pós-natal, em geral associado com múltiplas anormalidades sistêmicas⁽³²⁾.

Alguns exemplos são as síndromes de Coffin-Síris (OMIM 135900), que tem como a principal causa defeitos no gene *ARID1B* (OMIM 614556), e a síndrome de Floating-Harbour (OMIM 136140), causada por defeitos no gene *SRCAP* (OMIM 611421), ambos os genes tem papel importante na remodelação da cromatina^(41, 42). Assim como a síndrome Cornélia de Lange (OMIM 122470), causada principalmente por defeitos moleculares no gene *NIPBL* (OMIM 608667), gene que codifica uma proteína essencial para a coesão das cromátides irmãs durante a multiplicação do DNA⁽⁴³⁾. Outro exemplo é a síndrome de Bloom (OMIM 210900), que tem como causa mutações no gene *BLM* ou *RECQL3* (OMIM 600537), responsável pelo correto funcionamento da recombinação genética⁽⁴⁴⁾.

1.4.4 Defeitos em fatores parácrinos que regulam a cartilagem de crescimento

Neste grupo são incluídos defeitos moleculares em genes participantes de vias que agem na cartilagem de crescimento, como a via de sinalização dos fatores de crescimento do fibroblasto (*FGFs*) e seus receptores, o exemplo mais

conhecido é o gene *FGFR3* (OMIM 134934), que quando mutado pode levar a uma doença denominada acondroplasia (OMIM 100800)⁽⁴⁵⁾.

Dentro desta divisão, ainda se encontram as vias de sinalização que determinam a morfologia, proliferação e diferenciação dos condrócitos da cartilagem de crescimento, que pertencem ao grupo fator de crescimento transformador Beta (*TGFβ*), os fatores que participam da mobilidade e polaridade celular, como *ROR2* (OMIM 602337), a via *PTHrP-IHH* (*Peptídeo relacionado a hormônios da paratireoide – Indian hedgehog*), a qual age como um feedback negativo para hipertrofia e proliferação dos condrócitos, e também a via *CNP* (OMIM 123830) e seu receptor *NPR2* (OMIM 108961), que apresenta papel fundamental na regulação do crescimento ósseo endocondral, promovendo a síntese da matriz cartilaginosa e estimulação da proliferação e diferenciação dos condrócitos^(32, 46).

1.4.5 Defeitos em componentes da matriz extracelular da cartilagem de crescimento

Os condrócitos secretam uma matriz extracelular que contém colágenos, proteoglicanos e outras proteínas essenciais para as propriedades da cartilagem, que são compressão, resiliência estrutural e interação com moléculas que participam na cartilagem de crescimento. O gene *ACAN* (OMIM 155760) é um exemplo, cuja proteína codificada *Agrecan* é um dos componentes em maior quantidade na matriz extracelular e mutações em heterozigose neste gene podem ser responsáveis por um espectro fenotípico variável, desde baixa estatura proporcional até baixa estatura com displasias esqueléticas⁽⁴⁷⁾.

1.4.6 Síndrome dos genes contíguos

A síndrome dos genes contíguos compreendem a deleção ou duplicação de um grupo de genes que são responsáveis por fenótipos complexos, como podemos exemplificar com a deleção da região 22q11.21, associada à síndrome de DiGeorge (OMIM 188400), caracterizada por baixa estatura, aplasia/hipoplasia do timo e da tireoide, anormalidades cardíacas e faciais⁽⁴⁸⁾.

1.4.7 Defeitos de *imprinting*

O processo de *imprinting* determina a expressão diferencial dos alelos presentes por meio da metilação de um dos alelos, impedindo-o de ser expresso, e as doenças causadas por defeitos neste processo são denominadas doenças epigenéticas. Como exemplo, a hipometilação do alelo paterno da *região de controle de metilação H19/IGF2* (OMIM 616186) é responsável pela síndrome de Silver-Russel (OMIM 100860), caracterizada por baixa estatura, face triangular, assimetria corpórea, fronte ampla, e algumas outras deformidades físicas⁽⁴⁹⁾.

1.5 Sequenciamento paralelo em Larga Escala para investigação de baixa estatura

O uso da técnica de sequenciamento paralelo em larga escala para estudar baixa estatura é atualmente indicado para pacientes onde há suspeita clínica ou possibilidade de doença Mendeliana, seja ela causada por apenas um gene, principalmente nos casos de genes grandes ou causada por múltiplos

genes. Nesta situação é mais frequente o uso de painel de genes. Outra indicação para o uso desta técnica é para pacientes onde estudos moleculares prévios não tiveram resultado positivo ou que não seja possível estabelecer genes candidatos, havendo necessidade de uma análise mais ampla, permitida pela análise do exoma.

Até o presente momento, quatro estudos da literatura avaliaram pacientes com baixa estatura sem diagnóstico estabelecido, por meio de sequenciamento paralelo em larga escala. Wang et al. 2013, avaliou 1077 genes alvos, já descritos associados a baixa estatura em 192 pacientes e 192 indivíduos controle e solucionou apenas 2% dos casos, o que corresponde a 4 variantes consideradas patogênicas nos genes *PTPN11* (3 variantes), associadas a Síndrome de Noonan e 1 variante no gene *TRPV4*, associada a Braquiolmia tipo 3⁽⁵⁰⁾. Guo et al. 2014, analisou 14 pacientes com baixa estatura sem diagnóstico molecular pré-estabelecido, por meio do sequenciamento do exoma, com resultado positivo em 5 casos, o que corresponde a 36% da casuística. Foram encontradas variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas nos genes *OBSL1* e *CUL7*, associados à síndrome de 3-M, uma no gene *SRCAP*, associado à síndrome de *Floating-Harbour*, outra no gene *FAM11A*, associado à síndrome de *Kenny-Caffrey* e uma variante no gene *B4GALT7*, associada à síndrome de *Ehlers-Danlos*⁽⁵¹⁾.

Recentemente, Hauer et al., 2017, sequenciaram 200 exomas de pacientes com baixa estatura sem diagnóstico molecular, e solucionaram 17% dos casos, o que corresponde a 34 variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas, em genes previamente associados a doenças onde

baixa estatura é estabelecida, tais como *NPR2*, *KDM6A*, *KRAS*, *NF1*, *SLC26A2*, *PDE4D*, *ACAN*, *COL2A1*, dentre outros⁽⁵²⁾.

Outro estudo recente avaliou 86 pacientes japoneses com baixa estatura idiopática, por meio de um painel de genes associados a displasias esqueléticas e pertencentes ao eixo GH-IGF1. Como resultado, encontraram 4 variantes provavelmente patogênicas no *ACAN*, o que corresponde a 4,7 % da casuística estudada⁽⁵³⁾.

Porém nenhum estudo da literatura avaliou um grande número de pacientes nascidos PIG de forma sistemática. Portanto o presente estudo realiza uma avaliação ampla do sistema IGFs/IGF1R na baixa estatura de início pré-natal, incluindo a pesquisa de mutação de ponto em toda região exômica dos principais genes envolvidos neste sistema, além de incluir diversos genes sabidamente envolvidos em doenças associadas com distúrbio de crescimento e genes candidatos, baseado em nossos resultados prévios (Anexo A). Para tanto utilizamos a abordagem de sequenciamento paralelo em larga escala de amostras enriquecidas apenas pelas sequências de interesse, seguido por confirmação pela metodologia tradicional (Sanger).

É esperado alcançar uma melhor compreensão dos aspectos clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes com distúrbios do crescimento de início pré-natal. O rastreamento de defeitos genéticos no sistema IGFs/IGF1R em um grande grupo de pacientes nascidos PIG permitirá estabelecer a frequência e a importância de defeitos deste gene neste grupo de pacientes. Este é um ponto com aplicações práticas, visto que estes pacientes apresentam

comportamento distinto frente ao tratamento com hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) em comparação a população de crianças nascidas PIGs, uma indicação clássica para o tratamento com rhGH⁽⁵⁴⁾. Adicionalmente, o estudo de diversos genes associados a quadro sindrômico associado ao crescimento fetal atenuado, permite a identificação de diversas condições que são consideradas contraindicações ao tratamento com rhGH por estarem associadas ao maior risco de neoplasias, como Anemia de Fanconi e síndrome de Bloom⁽⁵⁵⁾.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Identificar a etiologia genética responsável pelo distúrbio de crescimento de crianças nascidas pequenas para idade gestacional que não apresentaram recuperação espontânea na vida pós-natal e correlacionar com os dados clínicos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a presença de variantes alélicas patogênicas em genes do sistema IGFs/IGF1R em um grupo de crianças com retardo de crescimento pré e pós-natal.

Avaliar o desempenho de um painel amplo de genes relacionado a distúrbios do crescimento em estabelecer o diagnóstico genético-molecular em crianças nascidas PIG com baixa estatura persistente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Todos os estudos são conduzidos de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde. A pesquisa atual (CAAE: 37868114.3.0000.0068) foi aprovada junto a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) conforme o parecer 1.175.278. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes. Os achados de defeitos genéticos relacionados a doenças monogênicas em investigação serão informados aos pacientes e/ou seus responsáveis legais que terão aconselhamento genético e segmento conforme o recomendado pela Sociedade Brasileira de Genética Médica no projeto Diretrizes do Conselho Federal de Medicina.

3.2 Casuística

A casuística do projeto foi selecionada entre crianças submetidas à investigação clínica e laboratorial extensa conforme protocolos de investigação de crianças com baixa estatura acompanhadas no ambulatório da Unidade de

Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da FMUSP (Anexos B e C). Estes pacientes constituem um grupo com alta probabilidade de apresentarem novos defeitos moleculares em genes ainda não estudados.

Os critérios de inclusão adotado foi selecionar crianças nascidas pequenas para idade gestacional (PIG) (Escore-Z do peso e/ou comprimento ao nascer abaixo de -2,0), com ausência de recuperação espontânea do crescimento após o nascimento (Z da altura inferior a -2,0 em idade superior ou igual a 2 anos de idade) e sem causa etiológica estabelecida. Os valores de Escore-Z de comprimento e peso ao nascimento foram calculados seguindo os critérios de Usher and McLean, 1969⁽⁵⁶⁾. Os valores de Z para altura, peso e índice de massa corpórea (IMC) foram calculados utilizando a curva de referência americana⁽⁵⁷⁾, validade para a população brasileira⁽⁵⁸⁾.

Os critérios de exclusão utilizados foram a identificação de causas materno-placentárias de retardo de crescimento intrauterino como: hipertensão arterial, diabetes, descolamento prematuro de placenta, tabagismo e TORCH (toxoplasma, vírus da rubéola, sífilis, citomegalovírus e herpes vírus); presença de causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento como presença de distúrbios genéticos já identificados, desnutrição, doenças hepáticas, doenças sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas. A estratégia de seleção da casuística encontra-se na figura 1.

Figura 1. Resumo da seleção da casuística e estratégia para o estudo de crianças nascidas pequenas para idade gestacional. O sequenciamento alvo de genes candidatos será realizado utilizando a plataforma NextSeq da Illumina.

3.3 Estudos Moleculares

3.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou de células extraídas por *swab* da mucosa oral dos indivíduos arrolados na pesquisa. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo. A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material

é entre 1,80 e 2,00. As amostras foram mantidas congeladas a – 20 °C até seu uso.

3.3.2 Genotipagem por sequenciamento paralelo em larga escala

A Figura 2 mostra esquema das etapas principais do sequenciamento paralelo em larga escala.

Sequenciamento Paralelo em Larga Escala

Figura 2. Esquema das principais etapas do sequenciamento paralelo em larga escala. 1. Primeiramente ocorre a fragmentação do material genômico e a ligação a adaptadores. 2. Hibridação com sondas de biotina e captura dos genes alvos com beads de estreptavidina. 3. Ligação dos adaptadores a pequenas sequências que ficam em uma placa denominada flowcell, onde ocorre a amplificação clonal. 4. Ocorre o sequenciamento propriamente dito, que no caso é feito por síntese através de uma DNA polimerase, cada nucleotídeo adicionado emite um fluoróforo específico.

O processo do sequenciamento seguiu os protocolos recomendados pelos fabricantes para o preparo de bibliotecas para enriquecimento das regiões alvos e sequenciamento e envolve as seguintes etapas:

- I. Elaboração de um kit customizado para enriquecimento de regiões alvos utilizando a plataforma Sure Design: <https://earray.chem.agilent.com/suredesign/> (Agilent Technologies, CA, USA): O kit foi desenhado contendo 390 genes listados no Anexo A e a região alvo compreende aproximadamente 2.1Mb.
- II. Confeção de bibliotecas: Realizado com o Kit Sure Select XT para enriquecimento de alvos (Agilent Technologies, CA, USA). Foram utilizados o Robô Bravo, Bench cell e MiniHub, também da Agilent^{TC}, como instrumentos para o preparo das bibliotecas por automação (Figura 2).
 - II.I. Fragmentação genômica: Seguindo o protocolo, as bibliotecas foram obtidas através da fragmentação mecânica do DNA genômico a 200ng em 50µL no aparelho Covaris (COVARIS INC., Woburn, USA), gerando fragmentos de tamanho entre 150-550 pares de base.
 - II.II. Reparo das extremidades: As extremidades dos fragmentos foram reparadas e posteriormente foi feita a adenilação das extremidades 3', o que facilita a ligação dos adaptadores no próximo passo do preparo de bibliotecas.
 - II.III. Ligação com adaptadores e amplificação: Adaptadores foram adicionados a cada extremidade dos fragmentos, para a posterior adição dos indexes e amplificação clonal. Os fragmentos contendo os adaptadores foram amplificados por PCR.

- II.IV. Hibridação: Nesta etapa, sondas biotiniladas foram hibridadas aos fragmentos. Estas sondas são específicas para os genes alvos desenhados no painel.
- II.V. Captura: Apenas os fragmentos hibridados foram capturados através de beads magnéticas associadas à estreptavidina, a qual se liga à biotina das sondas que foram hibridadas. Assim apenas os genes de interesse continuam no processo de preparo para o sequenciamento.
- II.VI. Indexação: A cada biblioteca foi adicionado um Index diferente de 8 pb. E os fragmentos indexados foram então amplificados. Após esta etapa, as bibliotecas foram quantificadas por Real-Time PCR. O tamanho dos fragmentos foi analisado no aparelho Tape Station da Agilent Technologies.
- II.VII. Pool: Com a quantificação e tamanho dos fragmentos acessíveis, foram feitos cálculos para que as diversas amostras pudessem ser combinadas em um pool final com as concentrações ideais por biblioteca. Foi feito um pool de 32 bibliotecas a 10 nM.
- II.VIII. Quantificação: O pool foi quantificado por real time PCR, para observar se estaria na concentração esperada de 10 nM.

As próximas etapas, referente ao sequenciamento propriamente dito, ocorreram no equipamento NextSeq da Illumina, utilizando o Kit NextSeq 500 v2

300 ciclos (Illumina, CA, USA), este kit tem a capacidade de gerar até 39 Gb de dados.

III. Amplificação clonal: nesta etapa, os fragmentos de DNA ligados às moléculas adaptadoras são depositados em uma lâmina especial denominada *flowcell*. Esta lâmina é constituída por 4 canaletas (ou *lanes*), em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela duas espécies de oligonucleotídeos, que são complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligos complementares presentes na superfície da *flowcell*, cada molécula é amplificada várias vezes através de uma reação conhecida como bridge PCR (PCR em ponte). Ao final, são gerados *clusters* (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

IV. Sequenciamento: após a amplificação clonal, as moléculas antisense são removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento é iniciado com o acoplamento de um primer especial. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos para cada nucleotídeo são adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação são geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* através de um scanner de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda (específico para cada fluoróforo). Os clusters presentes na superfície da *flowcell* são então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propicia a identificação

da sequência de bases nucleotídicas de cada cluster de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao cluster. Ao final, é gerado um arquivo com todas as sequências de cada paciente com a extensão “*.fastq” pelo programa Casava.

3.4 Análise de resultados

3.4.1 Bioinformática

A partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento acima descritos, foi realizado a análise bioinformática seguindo as seguintes etapas em colaboração com o Dr. Antonio Lerário responsável pelo processamento dos dados brutos até a geração de um arquivo em formato Excel contendo todas as variantes encontradas em cada amostra (arquivo VCF - *Variant Call Format*).

- I. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI): nesta etapa, a origem de cada fragmento do DNA da amostra é determinada. Inicialmente o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente. Após esta primeira etapa, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentem resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (por exemplo, quando existem pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A

recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Nesta etapa foi utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), e como resultado gera-se o arquivo com extensão “*.bam”.

- II. Genotipagem: a partir do melhor alinhamento possível, é realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par do cromossomo para uma dada posição). Freebayes foi utilizado para esta etapa. Esta ferramenta identifica SNVs e Indels gerando o arquivo VCF contendo todas as variantes identificadas e suas coordenadas genômicas;
- III. Anotação dos genótipos variantes detectados: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes encontradas utilizando o programa Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) de acordo com diversos parâmetros customizados. O resultado é uma planilha VCF contendo todas variantes já associadas a informações sobre localização, tipo, frequência em banco de dados e predições *in silico*;
- IV. Priorização das variantes candidatas: com toda a base de dados gerada a partir das etapas anteriores, algoritmos heurísticos de priorização são empregados para gerar uma lista ordenada e, de preferência, com poucas variantes para análise do pesquisador. Não existem critérios fixos e padrão para esta priorização. Em geral, considera-se desde parâmetros de alinhamento, como quantidade de *reads* confirmando a variante até ser uma variante supostamente deletéria ou não. Envolve uma ampla interação

com o pesquisador e depende do conhecimento do mesmo em relação ao fenótipo analisado.

A VCF contém todas as variantes genéticas identificadas nos pacientes, que são analisadas pelo pesquisador. Neste banco de dados foram aplicados os seguintes filtros sequenciais para gerar uma lista limitada de variantes potencialmente relacionadas com o fenótipo (Figura 3):

Figura 3. Fluxo da estratégia de filtragem utilizada para selecionar as variantes com possibilidade de patogenicidade em 80 pacientes PIG submetidos ao sequenciamento de genes alvos pelo painel Sure Select

- I. Variantes presentes no paciente, em homozigose, heterozigose composta ou heterozigose simples de acordo com o modelo de herança sugerido pela análise de familiares;
- II. Variantes raras, com frequência menor ou igual a 1% em bancos de dados públicos que correspondem a 99% das variantes alélicas encontradas em seres humanos, como os bancos 1000 genomas (<http://browser.1000genomes.org/>) e gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>);
- III. Aquelas com Frequência baixa (<1%) em banco de dados interno do laboratório, que contém aproximadamente 390 indivíduos, o que corresponde a 780 alelos;
- IV. Filtrou-se apenas as variantes presentes em Exons ou Splicing site (+5 e -5)
- V. E também foram filtradas as que sugeriam stop-códon, ganho ou perda, mudança de frame para a leitura correta dos aminoácidos e as não sinônimas;
- VI. Depois destas filtragens iniciais, foram analisadas as predições de patogenicidade para as variantes de troca de um único nucleotídeo (SNVs – *single-nucleotide variants*) por diversas ferramentas *in silico*, os critérios de classificação de cada ferramenta encontram-se na Tabela 1.
- VII. Das variantes selecionadas até esta etapa, foi analisada a compatibilidade com a herança sugerida e a plausibilidade biológica em relação ao fenótipo:

- OMIM: <http://www.omim.org/>;

VIII. Avaliou-se ainda banco de dados de mutações associadas a doença:

- OMIM: <http://www.omim.org/>;
- Clinvar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>;
- HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>;

IX. Nessa etapa, foram avaliados os dados de um banco de controles da variação genética brasileira, obtidos em uma população de 609 idosos saudáveis (1218 alelos), em colaboração com o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP: Abraom: <http://abraom.ib.usp.br/>

Tabela 1. Critérios de classificação de patogenicidade das ferramentas *in silico* utilizadas nas filtragens da VCF.

Ferramenta	Classificação	Critérios utilizados	Endereço eletrônico
Modelo de predição para alteração do sítio de splice			
dbscSNV_ADA_SCORE e dbscSNV_RF_SCORE	Entre 0 e 1	$\geq 0,6$	https://sites.google.com/site/jpopen/dbNSFP
Modelo de predição de patogenicidade			
SIFT	T=Tolerado D=Deletério	D	http://sift.jcvi.org/
CADD	Numérico	≥ 15	http://cadd.gs.washington.edu/
Mutation Acessor	L=Leve M=Moderado H=Alto.	M e H	http://mutationassessor.org/
Mutation Taster	A e D=Deletério N e P=Não deletério/ Polimorfismos	A e D	http://www.mutationtaster.org/
Provean	N=Neutro D=Deletério	D	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php
POLYPHEN	B=Benigno P=Possivelmente patogênico D=Deletério.	P e D	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Modelo para grau de conservação do aminoácido envolvido			
GERP	Numérico	≥ 2	http://mendel.stanford.edu/DownloadLab/downloads/gerp/

X. Afim de confirmar se a chamada da variante era verdadeira, foi utilizado o programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*) do Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>), que permite visualizar todos os *reads* gerados no sequenciamento alinhados ao genoma referência (Figura 4).

Figura 4. Exemplo da visualização de uma variante não sinônima (acima) e uma deleção (abaixo) no programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*).

Na sequência, foram selecionadas apenas aquelas variantes em genes que pudessem justificar o fenótipo do paciente e estas seguiram para segregação, confirmação por Sanger e classificação de patogenicidade.

A classificação das variantes em relação ao fenótipo do paciente foi realizada seguindo o guia de recomendação da ACMG-AMP (American of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology)⁽⁵⁹⁾. Este guia promove linhas de evidência para classificação de patogenicidade, que inclui frequência na população, análise *in silico*, dados de segregação, dados de análises funcionais, dentre outros. As evidências são classificadas como muito forte (VS), forte (S), moderada (M) e pequena (P). Dependendo da combinação destas evidências, a variante é classificada dentre uma das 5 opções: patogênica (P), provavelmente patogênica (LP), variante de significado incerto (VUS), provavelmente benigna (LB) e benigna (B) (Anexos D e E). Para apoiar a interpretação da segregação familiar, foi adotado um critério matemático quantitativo que foi adicionado recentemente ao guia de interpretação da ACMG-AMP, que promove uma quantificação estatística dos dados da segregação familiar⁽⁶⁰⁾. Utilizamos também o auxílio de um programa que classifica as variantes instantaneamente de acordo com este guia, com a possibilidade de editar pessoalmente os resultados para outras evidências, como compatibilidade fenotípica e segregação, denominado InterVar (<http://wintervar.wglab.org/>).

Ademais, foi realizada a análise do número de cópias (CNVs) pelo programa *COpy Number Targeted Resequencing Analysis* (CONTRA; <http://contra-cnv.sourceforge.net/>) (Figura 5), pois a análise do *Freebayes* é ineficiente para chamar este tipo de variante.

Figura 5. Exemplo da visualização do gráfico gerado pelo programa CONTRA. Podemos observar uma deleção no gene *GHR* (X indicado pela seta). Esta deleção (Exon 3 do gene) é um polimorfismo existente na população.

3.4.2 Sequenciamento Automático Tradicional

Novas alterações identificadas foram validadas por sequenciamento pela técnica de Sanger. Em resumo, utilizando *primers* flanqueando a região alvo será amplificada por PCR. Todas as amplificações serão acompanhadas de um controle negativo. Os produtos amplificados serão submetidos a uma purificação enzimática com a enzima ExoSAP-IT conforme a recomendação do fabricante. A reação de sequenciamento será realizada utilizando o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O produto desta reação será submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A leitura dos eletroferogramas será realizada através do programa Sequencher 4.10.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

3.4.3 Análise estatística

Os resultados foram comparados conforme a classificação clínica inicial entre síndrômicos com síndrome reconhecida, sem síndrome reconhecida e não síndrômicos, através do teste exato de Fisher. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com SigmaStat 4.0 (Systat Software Inc. Chicago, IL).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes selecionados para o estudo

Foram selecionados 80 pacientes nascidos pequenos para idade gestacional sem recuperação espontânea até o segundo ano de vida (Anexo F). Com base na presença de dismorfismos, déficit intelectual, atraso do desenvolvimento e/ou malformações maiores, os pacientes foram classificados como não síndrômicos (n = 46) e síndrômicos (n = 34). Destes, 7 pacientes apresentavam suspeita clínica de síndrome de Noonan (OMIM 163950), 3 de síndrome de Bloom (OMIM 210900), 2 de síndrome de Floating-Harbor (OMIM 136140), 2 de acondroplasia (OMIM 100800), 1 de síndrome de Cornélia de Lange (OMIM 122470), 1 de síndrome de Silver-Russell (OMIM 180860), e 1 de Síndrome de Coffin Sís (OMIM 135900). Todos sem confirmação molecular. Os pacientes com suspeita de Noonan tiveram anteriormente estudo genético baseado no sequenciamento de *hotspots* inconclusivos. O paciente com suspeita clínica de Silver-Russel foi estudado para dissomia uniparental do cromossomo 7 e defeitos de metilação do *locus* 11p15 que não demonstraram anormalidades. A paciente com suspeita de Cornélia de Lange apresentava quadro leve compatível com a síndrome. Os demais pacientes não apresentaram quadro clínico sugestivo de síndromes conhecidas (n = 63). Na tabela abaixo se encontram resumidas as características da casuística estudada.

Tabela 2. Caracterização da casuística selecionada para o estudo dos genes alvo.

Características da casuística	Dados
Consanguinidade (%)	8,8%
Baixa estatura familiar (%)	42,5%
Sexo (M:F)	41:39
Idade gestacional (semanas)	38 ± 3
Prematuridade (%)	6,3%
Escore-Z do peso ao nascimento	-2,1 ± 1
Escore-Z do comprimento ao nascimento	-3,1 ± 1,9
Idade da 1ª avaliação	9,3 ± 5,5
Escore-Z da altura	-2,9 ± 0,7
Escore-Z do IMC	-1,1 ± 1,6
Microcefalia (%)	17,5%
Atraso no DNPM ou déficit intelectual (%)	31,3%

4.2 Resultados do painel Sure Select^{XT} da Agilent

4.2.1 Métricas do sequenciamento

Foram preparadas 96 bibliotecas com o kit de painel Sure Select da empresa Agilent. Estas foram sequenciadas utilizando o kit NextSeq 500 v2 mid output. Este kit possui a capacidade de gerar até 39 Gb de dados e foi optado por incluir até 32 amostras por corrida de sequenciamento para atingir a cobertura desejada por pacientes de aproximadamente 300 vezes. Com isso, foram obtidas corridas onde a cobertura média foi de 354 vezes e com mais de 99% da região alvo com cobertura > 10 *reads* (Tabela 3).

Das 96 bibliotecas preparadas, 16 amostras foram de pacientes que não completaram todos os critérios de inclusão da casuística e por esta razão foram excluídas na análise final.

Tabela 3. Análise métrica da corrida referente ao painel de genes de distúrbio de crescimento de 96 pacientes analisados utilizando o kit NextSeq 500 v2 mid output.

	Nº de bases geradas	Cobertura	Porcentagem da região alvo com	
			>10 reads	>20 reads
Mediana	712.013.151 pb	354X	99,3%	98,5%
Máximo	1.065.960.629 pb	500X	99,5%	99,0%
Mínimo	569.845.585 pb	273X	99,1%	98,1%

O resultado do sequenciamento seguiu a filtragem previamente descrita, e resultou na seleção de variantes de interesse para serem confirmadas e segregadas por SANGER para posterior avaliação seguindo os critérios definidos pelo ACMG-AMP. Os resultados das filtrações dos 3 painéis individualmente encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Variantes encontradas nas 3 corridas separadamente ao longo da filtragem, assim como as variantes selecionadas para segregação em familiares.

Corrida	Nº de pacientes	Variantes totais	Variantes raras em exons e sítios de splicing	Excluindo as sinônimas (média por paciente)	Variantes para segregação na família (nº por paciente)
1	32	6.799	1.007	574 (19 ± 4)	25 (1 a 2)
2	32	6.995	1.078	604 (19 ± 5)	14 (1 a 3)
3	32	7.050	1.057	601 (19 ± 6)	19 (1 a 3)

4.3 Análise global das variantes de interesse encontradas

Foram selecionadas 58 variantes como de interesse para estudo adicional e segregação em familiares. A maioria das variantes foi identificada em heterozigose simples ($n = 50$) e a patogenicidade foi analisada de acordo com modelos dominantes de herança, enquanto 6 variantes encontram-se em estado heterozigoto composto em 3 pacientes, a análise foi realizada de acordo com modelo recessivo, assim como duas variantes encontradas em homozigose. Três variantes foram recorrentes, sendo identificada em mais de um paciente. Das 58 variantes, 18 foram consideradas patogênicas (P) ou provavelmente

patogênicas (PP) em 19 pacientes (Tabela 5), destas 8 variantes não estavam previamente descritas na literatura. Ainda foram identificadas 7 variantes classificadas como provavelmente benigna (PB) ou benigna (B) e 32 variantes de significado incerto (VUS) que ainda precisam de mais estudos para caracterizar a patogenicidade (Anexo G). Uma variante foi considerada provavelmente patogênica, porém não associada à baixa estatura, e foi considerada um achado acidental. Dez variantes não foram segregadas por falta de material familiar.

Adicionalmente, pela análise da presença de CNVs, observamos uma deleção multiexônica no gene *BLM* associado à síndrome de Bloom em dois pacientes que será discutido detalhadamente nas páginas 58 e 59. Ainda identificamos uma deleção multigênica no cromossomo 22, discutida nas páginas 69 e 70.

Tabela 5. Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas encontradas no sequenciamento de genes alvo em crianças nascidas FIG. Número referência da variante no dbSNP, tipo de herança, fenótipos associados e classificação de patogenidade de acordo com o guia da ACMG-AMP.

Gene	Variante	dbSNP ID	Nº Pacientes	Herança	Fenótipo associado	Classificação ACMG/AMP
ANKRD11	c.2408_2412del;p.Lys803Argfs*5	N.D.	1	Dominante	Síndrome de KBG	Patogênica
ANKRD11	c.7195C>T; p.Gln2399*	N.D.	1	Dominante	Síndrome de KBG	Patogênica
BLM	Del exons 20-22	N.D.	2	Recessivo	Síndrome de Bloom	Patogênica
NPR2	c.1249C>G; p.Gln417Glu	rs796065356	1	Dominante	Baixa estatura proporcional	Patogênica
PTPN11	c.1403C>T; p.Thr468Met	rs121918457	1	Dominante	Síndrome de Leopard	Patogênica
PTPN11	c.794G>A; p.Arg265Gln	rs376607329	1	Dominante	Síndrome de Noonan	Patogênica
SHOC2	c.4A>G; p.Ser2Gly	rs267607048	1	Dominante	Síndrome de Noonan	Patogênica
SRCAP	c.7303C>T; p.Arg2435*	rs199469465	1	Dominante	Síndrome de Floating-Harbour	Patogênica
SRCAP	c.7262dupG; p. Ser2421Glnfs*21	N.D.	1	Dominante	Síndrome de Floating-Harbour	Patogênica
FGFR3	c.1138G>A; p.Gly380Arg	rs28931614	2	Dominante	Acondroplasia	Patogênica
IGF1R	c.202G>T; p.Glu68*	N.D.	1	Dominante	Resistência a IGF1	Patogênica
Del 22q11	Deleção (DGCR8, TBX1 e LZTR1)	N.D.	1	Dominante	Síndrome de DiGeorge	Patogênica
BLM	c.3164G>C; p.Cys1055Ser	rs367543029	1	Recessivo - heterozigose composta	Síndrome de Bloom	Provavelmente Patogênica
NIPBL	c.5582G>A; p.Gly1861Asp	N.D.	1	Dominante	Síndrome de Cornelia de Lange	Provavelmente Patogênica
NPR2	c.94C>A; p.Pro32Thr	rs28931581	1	Dominante	Baixa estatura proporcional	Provavelmente Patogênica
PTPN11	c.598A>T; p.Asn200Tyr	rs727503381	1	Dominante	Síndrome de Noonan	Provavelmente Patogênica
SHOX	c.503G>A; p.Arg168Gln	N.D.	1	Dominante	Baixa estatura idiopática familiar	Provavelmente Patogênica

*ND: Não Descrito

Sequências referências no NCBI: ANKRD11 (NM_013275); BLM (NM_000057); NPR2 (NM_003995); PTPN11 (NM_002834); SRCAP (NM_006662); IGF1R (NM_00875); NIPBL (NM_133433); SHOC2 (NM_007373); SMARCA4 (NM_001128844); SOS1 (NM_005633); SHOX (NM_000451).

Nove variantes classificadas como patogênicas/provavelmente patogênicas foram encontradas em onze pacientes em genes que confirmam o diagnóstico clínico realizado o que corresponde a 59% (Tabela 6). Foram encontradas 4 variantes patogênicas em pacientes sindrômicos sem diagnóstico clínico específico ou divergente do diagnóstico clínico. Duas variantes no *ANKRD11*, associado à Síndrome de KBG. Uma microdeleção da região 22q11, variante é associada à síndrome de DiGeorge. E uma variante no *IGF1R* em um paciente inicialmente com o diagnóstico clínico de síndrome de Silver-Russell. O que corresponde a 23,5% destes casos solucionados.

Assim sendo, dos 34 pacientes sindrômicos, foi possível estabelecer o diagnóstico molecular em 15 casos, o que corresponde a 44,1% de diagnósticos realizados dentre estes pacientes.

Tabela 6. Diagnóstico genético obtido por sequenciamento paralelo em larga escala através de um painel de genes candidatos em pacientes com síndromes reconhecidas clinicamente.

Diagnóstico clínico (OMIM#)	Gene/Região	Nº de pacientes testados	Nº de pacientes confirmados
Acondroplasia (#100800)	<i>FGFR3</i>	2	2
Síndrome de Bloom (#210900)	<i>BLM</i>	3	3
Síndrome de Noonan (#163950)	<i>PTPN11/SHOC2</i>	7	3
Síndrome de Floating-Harbor (#136140)	<i>SRCAP</i>	2	2
Síndrome de Cornelia de Lange (#122470)	<i>NIPBL</i>	1	1
Síndrome de Coffin-Siris 1 (#135900)	<i>SMARCA4/ARID1B</i>	1	0
Síndrome de Silver Russel (#180660)	<i>H19/IGF2</i>	1	0
Total	-	17	11 (59%)

Dos 46 pacientes clinicamente classificados como não síndrômicos, foram encontradas duas variantes no gene *NPR2* em 2 pacientes com baixa estatura sem anormalidades esqueléticas, uma outra variante foi encontrada no gene *PTPN11* em pacientes sem suspeita clínica de SN, e uma variante foi encontrada no *SHOX*, associado a baixa estatura idiopática familiar. Essas 4 variantes correspondem a uma taxa de 8,7% de diagnóstico molecular positivo para pacientes não síndrômicos, inferior a taxa observada em pacientes síndrômicos (44,1%, $p < 0,001$). Os resultados positivos dos pacientes síndrômicos com síndrome estabelecida (11/17, 59%), também foi maior ($p < 0,032$) em relação pacientes síndrômicos sem síndrome estabelecida (4/17, 23,5%).

Uma variante ganho de stop códon no gene *SMARCA4* (c.832G>T;p.Gly278*), foi classificada provavelmente patogênica pelos critérios de classificação utilizados, mas considerada um achado accidental, visto que a síndrome associada a variantes *nonsense* neste gene não levam a baixa estatura.

Sete variantes foram encontradas em genes associados com distúrbio de crescimento e o fenótipo do paciente é compatível com o esperado, porém a variante foi classificada como VUS por falta de evidências que comprovem a patogenicidade. Estas variantes foram encontradas em 6 genes diferentes, *SHOC2*, *VPS13B* (em heterozigose composta), *GHSR*, *GH1*, *IGF1R* e *KDM6A* (Tabela 7).

Duas variantes foram encontradas em genes considerados candidatos, pois ainda não possuem fenótipo associado à baixa estatura em humanos, porém tem potencial de estar envolvido como fenótipo do paciente por participar de vias essenciais, como *PIK3CA* que participa da via de sinalização de receptores tirosinaquinase via AKT/PKB-mTOR e *IGFBP3*, que faz parte da via dos IGFs (Tabela 7). A variante no *PIK3CA* foi encontrada em heterozigose, também presente no pai e na irmã baixos. Já a variante no *IGFBP3*, foi encontrada em heterozigose, porém não foi segregada por falta do DNA familiar.

Das outras variantes consideradas como de significado incerto, encontramos variantes preditas como deletérias na maioria dos modelos *in silico*, com frequência extremamente baixa ou nula nos bancos populacionais, porém não possuímos uma caracterização fenotípica completa do paciente para

associar o fenótipo com a variante ou não possuímos o DNA de familiares para segregação.

4.4 Análise das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas

A seguir iremos detalhar as variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, incluindo a deleção multigênica, apresentando os resultados agrupados pelos principais mecanismos causadores de distúrbio de crescimento.

4.4.1 Variantes em genes no sistema IGFs/IGF1R

I. Gene *IGF1R*

O gene *IGF1R* codifica o receptor para IGFs⁽⁶¹⁾. Das características clínicas associadas a defeitos genéticos no *IGF1R*, pode-se citar a baixa estatura de início pré-natal com persistência pós-natal, altos níveis de IGF1 circulantes, podendo apresentar microcefalia³². Variantes em homozigose ou heterozigose composta levam a um fenótipo mais grave do que variantes em heterozigose^(62, 63). Enquanto variantes em heterozigose simples causariam fenótipo variável⁽⁶¹⁾. Este estudo identificou 2 variantes em heterozigose no *IGF1R*, uma variante perda de função (Loss-of-function, LoF), considerada patogênica (c.202G>T;p.Glu68*) e outra de significado incerto (c.4009C>T;p.Arg1337Cys) (Tabela 7).

Tabela 7. Variantes consideradas de significado incerto, porém podem explicar o fenótipo do paciente.

Gene	Variante	dbSNP ID	Genótipo/Herança	Fenótipo associado (#OMIM)	Achados clínicos do paciente
SHOC2	c.1660A>G; p.Ser554Gly	rs771053632	Dominante/N.D.	Síndrome de Noonan (#163950)	<i>Pectus excavatum</i> , orelhas com rotação incompleta, hélice auricular espessada, filtro nasal amplo, base do nariz alargado, clinodactilia e estenose pulmonar.
VPS13B	c.3866C>G;p.Thr1289 Ser c.11823_11824insGAT; p.V3941delinsVD	rs145569846 rs386834068	Recessivo/N.D.	Síndrome de Cohen (#216550)	Defeito de linha média, microcefalia, má formação de válvula mitral
GHSR	c.271C>T;p.Leu91Phe	N.D.	Dominante/materna	Deficiência parcial de hormônio de crescimento (#615925)	Baixa estatura familiar, IGF-1 reduzido com secreção de GH normal
GH1	c.G470A;p.Gly157Asp	rs201165777	Dominante/N.D.	Deficiência de hormônio de crescimento (#173100)	<i>Pectus excavatum</i> , macrocefalia, leve desproporção, secreção de GH normal, IGF1 limite inferior, ótima resposta ao tratamento com rhGH
IGF1R	c.4009C>T;p.Arg1337 Cys	rs141802822	Dominante/N.D.	Resistência a IGF-1 (#270450)	Dificuldade de ganho de peso, face triangular, base do nariz alargada, epicaneto, nistagmo horizontal, hipospádia
KDM6A	c.3058A>G; p.Ile1020Val	N.D.	Dominante/N.D.	Síndrome de Kabuki (#300867)	Atraso e dificuldade de aprendizado, paralisia cerebral atáxica
PIK3CA	c.563G>A;p.Gly188Glu	N.D.	Dominante/paterna	Gene candidato*	Baixa estatura familiar
IGFBP3	c.236A>G;p.Gln79Arg	N.D.	Dominante/ N.D.	Gene candidato*	Baixa estatura familiar, atraso puberal e leve dificuldade de acompanhamento escolar, valores normais de IGF-1 e IGFBP-3

N.D.: Não disponível DNA familiar para confirmar herança. *Não existe fenótipo associado à baixa estatura em humanos.

I.I. *IGF1R*: c.202G>T;p.Glu68*

A variante c.202G>T;p.Glu68*, localizada no exon 2 do gene *IGF1R*, foi encontrada em um paciente do sexo masculino, filho de pais com altura normal, nascido a termo com peso ao nascimento (PN) igual 1030 g (Z = -2) e comprimento ao nascimento (CN) igual a 45,5 cm (Z= 3,5). Aos 2 anos e 8 meses apresentava 81 cm de altura (Z= -3,1) e índice de massa corpórea (IMC) de 13 (Z= -3,5). Dentre outras características fenotípicas, apresentava face triangular e DNPM normal. Exame laboratorial aos 5,5 anos de idade mostrou nível de IGF1 = 236 ng/mL (referência 50 a 286 ng/mL) e IGFBP3 = 4,2 ng/mL (1,1 a 5,2 ng/mL) dentro da normalidade, a dosagem basal de GH foi de 1,25 ng/mL, porém o paciente não realizou teste de liberação, nem foi tratado com rhGH.

Esta variante foi classificada como patogênica por ser ausente nos bancos populacionais (PM2), caracterizar a perda de função da proteína (PVS1) e o paciente apresentar um fenótipo compatível com o esperado para variantes neste gene (PP4), mesmo apresentando níveis normais de IGF1 e IGFBP3, pois má nutrição pode abaixar os níveis destes hormônios, e o IMC do paciente indica uma insuficiência alimentar⁽⁶⁴⁾.

4.4.2 Variantes em genes da via RAS/MAPK

I. Gene *PTPN11*

O gene *PTPN11* pertence à via de sinalização RAS/MAPK, variantes neste gene que levam a uma hiperativação desta via estão associadas à

Síndrome de Noonan (SN, OMIM 163950) e outras condições semelhantes como a Síndrome de Leopard (SL, OMIM 151100) e Síndrome de Costello (SC, OMIM 218040). Estas síndromes são classificadas atualmente como RASopatias e são caracterizadas por anormalidades congênitas múltiplas, alterações faciais típicas, baixa estatura, defeito cardíaco congênito (mais frequentemente a estenose de valva pulmonar, cardiomiopatia hipertrófica e defeitos septais), deformidade torácica (*pectus excavatum* e/ou *carinatum*) além de outras alterações menos frequentes (atraso no desenvolvimento motor e/ou da linguagem, dificuldade de aprendizado, discreto retardo mental, hepatoesplenomegalia, distúrbios de coagulação, atraso puberal e criptorquidia)^(40, 65).

Na análise do painel foram identificadas 4 variantes no gene *PTPN11* em 4 pacientes todas em heterozigose, 2 foram considerada patogênicas (c.794G>A; p.Arg265Gln e c.1403C>T;p.Thr468Met), 1 provavelmente patogênicas (c.598A>T;p.Asn200Tyr) e 1 provavelmente benigna (c.1678C>T; p.Leu560Phe).

I.I. *PTPN11* c.1403C>T;p.Thr468Met

Esta variante foi encontrada em uma paciente do sexo feminino, filha única de pais de altura normal nascida pré-matura de 35 semanas, com PN de 1540 g (Z= -2,6) e CN de 39 cm (Z= -4,0). Iniciou o acompanhamento aos 8,4 anos, quando apresentava altura de 116 cm (Z= -2,4), peso de 17,6 kg (Z do IMC= -2,2), caracterizando retardo de crescimento de início pré-natal com manutenção na vida pós-natal. Clinicamente, apresenta filtro nasal apagado,

base do nariz alargada, epicanto, ângulo da boca voltado para baixo, retrognatia, pavilhão auricular com helix espessada e implantação normal, globo ocular protuso sem ptose, *Pectus carinatum* superior, *Pectus excavatum* inferior e estenose pulmonar monocúspide, características que sugeriam Síndrome de Noonan. Porém o estudo molecular focado nos *exons hotspots* do *PTPN11* (exon 3, 7, 8 e 13) não identificou variante patogênica.

Seguindo o guia de classificação de patogenicidade da ACMG-AMP, a variante identificada no painel foi classificada como patogênica, pois possui descrição em estudos prévios (PS1), é ausente em controles e presente em frequência baixa compatível com a doença em bancos de dados de pacientes (GnomAD MAF= 0,0008%) (PM2), existe estudo funcional descrevendo-a como deletéria⁽⁶⁶⁾ (PM1), é patogênica pela análise *in silico* (n=7/7) (PP3) e variantes *missense* neste gene são mecanismo de doença (PP2). Pela segregação nos pais, concluímos que a variante foi herdada da mãe, que apesar de não ser baixa, apresentava as mesmas características faciais da filha.

I.II. *PTPN11* c.794G>A; p.Arg265Gln

A variante no Exon7, c.794G>A;pArg265Gln do tipo *missense*, foi identificada em um paciente do sexo masculino, nascido a termo, filho de pai com altura normal e mãe baixa (Z=-2,4). O paciente nasceu com PN = 2680 g (Z=-1,6) e CN = 44 cm (Z=-3,5) e aos 12 anos apresentava 126 cm de altura (Z=-4,3) e 30 kg (Z do IMC = 0,3). O paciente não apresentava estigmas adicionais e SN não foi aventada durante a avaliação clínica. Esta variante é ausente no 1000 genomas e Abraom, possuindo uma frequência de 0,0004% no GnomAD

(PM2) e é descrita como patogênica em todos os sites de predição *in silico* (n=7/7) (PP3). Esta variante tem entrada como patogênica no Clinvar associada a Síndrome de Noonan (PS1). Variantes *missense* neste gene são comprovadamente mecanismo de doença (PP2). E existe estudo funcional descrevendo-a como deletéria (PS3)⁽⁶⁷⁾. Pacientes com essa mutação descritos na literatura, não apresentavam características faciais típicas de SN e a taxa de malformação cardíaca era de apenas 47%, relativamente menor do que as outras variantes associadas a SN⁽⁶⁷⁾. Portanto o fenótipo do paciente é compatível (PP4) e de acordo com o guia de classificação esta variante é patogênica. Infelizmente o DNA dos familiares não estava disponível para segregação.

I.III. *PTPN11*: c.598A>T;p.Asn200Tyr

Esta variante *missense*, localizada no exon 5 do *PTPN11*, foi encontrada em um paciente do sexo masculino, nascido prematuro com PN = 1520 g (Z=-2,1) e CN = 39,5 cm (Z=-3,2). Os pais apresentam altura normal. Aos 4 anos de idade apresentava 87 cm de altura (Z=-3,6) e peso 11,7 kg (Z do IMC = -2,2). Clinicamente suspeitava-se de SN, pelas seguintes características fenotípicas, epicanto, ptose palpebral, cílios longos e curvos, baixa implantação das orelhas, palato ogival, dentes pouco afastados, sobrancelhas rarefeitas, base nasal alargada, hipertelorismo mamário e estenose pulmonar. Portanto o fenótipo do paciente é compatível com variante encontrada (PP4).

Além disso, a variante é ausente nos bancos de dados analisados (PM2), é predita como deletéria na maioria dos modelos *in silico* (n=6/7) (PP3) e já existe

descrição como patogênica no Clinvar (PS1). De acordo com todas as evidências ela foi classificada como provavelmente patogênica.

II. Gene *SHOC2*

A proteína codificada por *SHOC2* participa da via RAS/MAPK, agindo na ligação de RAS com transdutores de sinais downstream desta cascata de sinalização⁽⁶⁸⁾. Mutações no *SHOC2* são associadas à síndrome de Noonan com perda de cabelos anágenos (OMIM 607721), que possui além das características fenotípicas da SN, a alopecia capilar.

II.I. *SHOC2* (c.4A>G;p.Ser2Gly)

A variante *missense* c.4A>G;p.Ser2Ggly, localizada no exon 1 do gene *SHOC2*, foi encontrada em heterozigose em uma paciente do sexo feminino, nascida a termo com PN 2060 g (Z=-3,0) e CN 50 cm (Z=-0,4). A paciente é filha de pais baixos, a mãe apresenta 150 cm de altura (Z=-2,0) e o pai 161 cm (Z=-2,1). Aos 4,7 anos de idade, apresentava 86,5 cm (z=-4,1) e 10 kg (Z do IMC=-1,7). Clinicamente, apresentava fácies sugestiva de SN, com ptose palpebral, epicanto, pescoço alado, micrognatia, orelhas com implantação baixa e com pavilhão displásico, hiperterolismo e alopecia capilar. Outras características são hepatomegalia e problemas cardíacos, como, prolapso de valva mitral, valvas atrioventriculares displásicas e com insuficiência de grau discreto. A paciente ainda apresentou um leve atraso do desenvolvimento motor.

A variante encontrada foi classificada como patogênica pois é ausente nos bancos populacionais (PM2), é localizada em *hotspot* para variantes patogênicas

neste gene (PM1), é predita como deletéria nos modelos *in silico* (n=6/7) (PP3), já foi descrita como patogênica associada a SN (PS1)⁽⁶⁹⁾ e o fenótipo da paciente é compatível com o achado molecular (PP4).

4.4.3 Variantes em genes participantes de processos celulares fundamentais

I. Gene *SRCAP*

O gene *SRCAP* codifica uma proteína ATPase componente do complexo SRCAP na multiproteína remodeladora da cromatina. Esta proteína é necessária para a incorporação da histona H2A.Z na conformação do DNA em nucleossomos. Mutações em heterozigose neste gene são responsáveis pela síndrome de Floating-Harbor (OMIM 136140), uma doença rara que tem como características fenotípicas baixa estatura, atraso na maturação óssea, atraso no DNPM principalmente no desenvolvimento da linguagem e face dismórfica típica⁽⁷⁰⁾, porém o mecanismo responsável pela doença não é bem compreendido.

A análise do painel identificou 2 variantes no gene *SRCAP* em heterozigose, uma mutação tipo *nonsense* (Exon 34: c.7303C>T:p.Arg2435*) e uma *frameshift* (Exon 34: c.7262dupG: p.Ser2421Glnfs*21), em um gene que não tolera variante tipo LoF. Estas variantes foram identificadas em pacientes com suspeita clínica da síndrome de Floating-Harbor.

I.I. *SRCAP* (c.7303C>T:p.Arg2435*)

Paciente do sexo feminino, nascida a termo, filha única de pais normais. Apresenta baixa estatura de início pré-natal, com PN 3090g (Z= -0,6) e CN 46,5

cm ($Z = -2,2$). Está em acompanhamento desde os 7 meses quando apresentava comprimento de 61,5 cm ($Z = -3,2$) e peso 4,5 kg ($Z = -4,6$). Clinicamente, possui olhos profundos e columela, cisto de aracnoide, apresentou um atraso importante da fala, fenótipo sugestivo de síndrome de Floating–Harbour. Exames laboratoriais realizados foram sem alterações e o cariótipo normal. Os pais são de altura normal e não consanguíneos, portanto sugerimos que a variante identificada no gene *SRCAP* seja de novo, apesar de não possuímos o DNA dos pais para análise do Sanger.

Seguindo o guia da ACMG-AMP, classificamos a variante como patogênica de acordo com os seguintes critérios: ser perda de função em um gene onde é descrita patogenicidade quando há este tipo de variante (PVS1), por estar localizada no *hotspot* para mutações deletérias (PM1), pela ausência em bancos populacionais (PM2). Há descrição prévia de patogenicidade na literatura (PS1)⁽⁷¹⁾.

I.II. *SRCAP* (c.7262dupG; p. Ser2421Glnfs*21)

Paciente do sexo masculino, nascido a termo, com pai normal e mãe baixa ($Z = -2,2$). O PN foi 2235 g ($Z = -2,7$) e CN 45 cm ($Z = -3,2$). Aos 7 anos e 4 meses de idade apresentava 106,8 cm de altura ($Z = -2,9$) e 19 kg (Z do IMC = 0,6). Clinicamente, apresentou atraso do DNPM principalmente da fala, tem olhos fundos, epicanto, cílios longos, lábio superior fino, palato ogival, dentes pouco afastados, nariz com columela, orelha direita com dismorfismo, mamilo esquerdo invertido e *pectus excavatum*, características que sugerem à Síndrome de

Floating-Harbor. A mãe deste paciente apresenta baixa estatura ($Z = -2,2$), porém sem alteração neurológica.

Esta variante também foi classificada como patogênica de acordo com os mesmos critérios da variante anterior no *SRCAP* (c.7303C>T:p.Arg2435*), excetuando a presença de descrição prévia.

II. Gene *BLM*

A proteína BLM é uma DNA helicase que suprime eventuais erros de recombinação, e também participa da replicação dos telômeros. Variantes em homozigose estão associadas à Síndrome de Bloom (OMIM: 210900), onde as mutações já descritas deletam ou alteram os motivos helicase e inibem a atividade 5'-3' helicase, resultando em *crossovers* meióticos não regulados⁽⁴⁴⁾. A síndrome de Bloom tem como principais características fenotípicas a baixa estatura com persistência pós-natal, microcefalia, leve retardo de DNPM, manchas café com leite na pele e maior risco de neoplasias. Laboratorialmente apresenta número aumentado de quebras cromossômicas observados na citogenética convencional⁽⁷²⁾.

Foram encontradas 3 variantes no *BLM*, uma deleção multiexônica dos 3 últimos exons do gene em homozigose em 2 pacientes não correlacionados, e duas outras variantes *missense* (c.3164G>C;p.Cys1055Ser e c.3427G>A;p.Glu1143Lys), em apenas 1 paciente resultando em heterozigose composta.

II.I. *BLM* (Deleção dos exons 20, 21 e 22)

Em dois pacientes identificamos uma variante não sinônima, em homozigose no exon 18 do gene *BLM* (c.3427G>A;p.Glu1143Lys). Esta variante estava ausente no GnomAD, porém apresentava uma frequência de 0,01% no 1000 genomas. A predição *in silico* sugere patogenicidade (n=7/7) e a variante já foi descrita associada a síndrome de Bloom. Porém, quando o arquivo CONTRA foi analisado, observou-se uma deleção em homozigose dos Exons 20, 21 e 22 do *BLM* (Figura 6), o que foi confirmada por visualização direta pelo IGV. Está deleção já foi descrita associada à síndrome de Bloom em pacientes de Portugal e do Brasil⁽⁷²⁾. Desta forma a variante não sinônima identificada está em desequilíbrio de ligação com uma variante LoF.

Figura 6. Visualização do gráfico gerado pelo CONTRA, com a deleção multiexônica em homozigose no *BLM* (ponto verde indicado pela seta).

A variante foi encontrada em duas pacientes do sexo feminino, a primeira nascida de gestação a termo com PN 1500g ($Z = -4,3$) e CN não disponível. Os pais são de altura normal e negam consanguinidade (sic). Aos 14,6 anos, a altura era 134,5 cm ($Z = -4,3$) e peso 23,2 kg (Z do IMC = $-4,5$). Apresenta características correspondentes a síndrome de Bloom como microcefalia, hipogonadismo hipergonadotrófico e leve retardo do DNPM. Tem história de tumor de Wilms tratada com sucesso aos 4 anos de idade. Cariótipo convencional mostrava quebras cromossômicas espontâneas.

A segunda paciente nasceu a termo com PN 2060g ($Z = -3,0$) e CN 45,5 ($Z = -2,8$). Aos 1,5 anos de idade apresentava 72 cm de altura ($Z = -2,7$) e 6,9 kg (Z do IMC = $-2,8$). Os pais apresentam altura normal, porém com história de consanguinidade. Das características clínicas da paciente, podemos observar quebras cromossômicas no cariótipo convencional, e algumas características faciais típicas de Bloom, como micrognatia, epicanto, microcefalia e fronte olímpica.

Seguindo o guia ACMG-AMP, esta deleção foi classificada como patogênica, por se uma deleção multiexônica em um gene onde variante perda de função é patogênica (PVS1), pela frequência (PM2), descrição prévia em estudo prévio confiável (PP5)⁽⁷²⁾, e fenótipo compatível (PP3). Pela PCR, confirmamos que os pacientes não amplificaram para os exons 20-22, enquanto os pais amplificaram, sugerindo que ambos são heterozigotos e o filho homozigoto para a deleção (PM6).

II.II. *BLM* (c.3164G>C;p.Cys1055Ser e c.3427G>A;p.Glu1143Lys)

Estas variantes foram encontradas em estado de heterozigose composta em um paciente do sexo masculino nascido com PN 1600g (Z=-2,8) e CN 39 cm (Z=-4,7). Aos 2,4 anos apresentava 78,3 cm de altura (Z=-3,2) e 7,2 kg (Z do IMC=-5,8). Clinicamente apresentava microcefalia, cabelos rarefeitos, micrognatia, sindactilia cutânea do 2º e 3º pododáctilo, filtro longo e apagado, face triangular, fronte proeminente, *pectus excavatum*, manchas *café au lait* e lesões eritematosas em região malar e fronte. Portanto tinha suspeita clínica inicial de síndrome de Bloom.

Uma das variantes (p.Cys1055Ser) tem frequência compatível para uma doença recessiva (MAF=0,00002) no gnomAD e a outra é ausente em todos os bancos populacionais (PM2). Ambas são preditas como deletérias nos modelos *in silico* (PP3), e a segregação familiar confirmou a herança do pai (c.3427G>A;p.Glu1143Lys) e da mãe (c.3164G>C;p.Cys1055Ser) (PP1). Além disso, a variante p.Cys1055Ser, já é descrita como patogênica no Clinvar (PS1). Portanto consideramos as variantes em heterozigose composta, como provavelmente patogênica.

III. Gene *ANKRD11*

A proteína ANKRD11 é membro da família de cofatores que contém repetição de anquirina que interagem com o receptor nuclear de coativadores p160 e inibe a ativação transcricional ligante-dependente⁽⁷³⁾. Pode agir na regulação da acetilação de histonas. Mutações em heterozigose com herança dominante neste gene estão associadas à síndrome de KBG (OMIM 148050),

que tem como características fenotípicas baixa estatura, microcefalia, hipertelorismo, face triangular na vida adulta, dentre outras características.

Foram encontradas 2 variantes do tipo perda de função em heterozigose no *ANKRD11*, uma é um ganho de *stop* códon (c.7195C>T; p.Gln2399*) e outra do tipo mudança de código do leitura (c.2408_2412del;p.Lys803Argfs*5).

III.I. *ANKRD11* (c.7195C>T; p.Gln2399*)

A variante foi encontrada em heterozigose em uma paciente do sexo feminino que nasceu a termo com PN 2600g (Z= -1,8) e CN 42 cm (Z= -4,6). Aos 7,9 anos tinha 111,6 cm de altura (Z= -2,2) e 19,5 kg (Z do IMC= -0,1). A paciente apresentava atraso no desenvolvimento e características dismórficas que não foram possíveis enquadrar em síndromes genéticas conhecidas. A avaliação laboratorial foi inconclusiva e a paciente possuía cariótipo normal.

Baseado nos critérios da ACMG-AMP, podemos classificar esta variante como patogênica pelos critérios a seguir, ausência em bancos de dados populacionais (PM2), por ser do tipo perda de função, em um gene onde já é descrita variante LoF causadora de doença (PVS1), e já foi descrita uma variante ganho de *stop* códon em um nucleotídeo próximo (p.Gln2397*) causadora da síndrome de KBG⁽⁷⁴⁾. Além dessas evidências, a segregação por Sanger confirmou a variante como *de novo* (PP1).

III.II. *ANKRD11* (c.2408_2412del;p.Lys803Argfs*5)

Esta variante foi encontrada em um paciente do sexo masculino, nascido a termo de pais com altura normal. O PN foi de 2520 g (Z= -2,0) e o CN 45 cm

(Z= - 3,1). Aos 8,5 anos de idade, este apresentava 104 cm de altura (Z= -4,3) e pesava 16,5 kg (Z do IMC = -0,4). Clinicamente foi avaliada uma insuficiência da válvula mitral e ectasia da aorta. Além disso, a face era sugestiva de SN.

Baseando-se nos critérios de classificação de variantes, podemos classificar esta variante como patogênica, de acordo com as seguintes evidências; ser ausente nos bancos de populacionais (PM2), ser predita como perda de função em um gene que não tolera este tipo de variante (PVS1) e já existir descrição desta mesma variante como sendo recorrente causa da Síndrome de KBG (PS1)⁽⁷⁵⁾.

IV. Gene *NIPBL*

A proteína *NIPBL*, quando complexada com proteína parceira, promove a ligação do complexo coesina às cromátides irmãs. Este processo é essencial para que as cromátides fiquem ligadas durante a segregação dos cromossomos homólogos da meiose I e reparos na dupla fita de DNA durante a fase G2 do ciclo celular que promove a reparação do DNA⁽⁷⁶⁾. Variantes em heterozigose no *NIPBL* são responsáveis por pelo menos metade dos casos descritos da síndrome Cornelia de Lange (OMIM 122470), uma doença caracterizada por retardo de crescimento e problemas no DNPM, e defeito em múltiplos órgãos⁽⁷⁷⁾.

Foi encontrada uma variante não sinônima em heterozigose no exon 30 do gene *NIPBL* (exon30: c.5582G>A; p.Gly1861Asp).

IV.I. *NIPBL* (c.5582G>A; p.Gly1861Asp)

A variante aqui descrita foi encontrada em uma paciente do sexo feminino que nasceu com 38 semanas, de pais com altura normal. O PN foi de 1880 g (Z=-3,1) e CN de 42 cm (Z= -4,3). Aos 15 anos apresentava 136 cm de altura (Z=-4,0). Como características fenotípicas apresenta palato ogival, estrabismo, sobrancelhas unidas, baixa implantação dos cabelos, orelha rodada e anteriorizadas com baixa implantação, *pectus excavatum*, clinodactilia do 5º dedo bilateral e estrias róseas em região abdominal. Além disso, apresentou atraso do DNPM, principalmente na alfabetização, e exames gerais foram normais. Baseado nos achados clínicos, suspeitava-se da síndrome Cornelia de Lange.

Esta variante está ausente no 1000 genomas, Abraom e no gnomAD (PM2) e predita como deletéria nas ferramentas *in silico* (n=7/7) (PP3). Esta variante nunca foi descrita, porém variantes não sinônimas em nucleotídeos próximos são consideradas como patogênica e associadas à síndrome de Cornelia de Lange (HGMD) (PP2). Mutações não sinônimas no gene *NIPBL*, são responsáveis por um fenótipo mais leve da síndrome, onde o retardo de crescimento e de DNPM são leves e não apresentam malformações tão evidentes⁽⁷⁷⁾. Portanto o fenótipo da paciente pode ser justificado por esta variante (PP4). Assim que a segregação da variante for realizada na família e confirmada como *de novo* na paciente (PM6). Portanto foi classificada como provavelmente patogênica.

4.4.4 Variantes em fatores parácrinos que regulam a cartilagem de crescimento

I. Gene *NPR2*

A proteína codificada por *NPR2* é responsável por catalisar a conversão de GMP (Guanosina monofosfato) intracelular para cGMP (Guanosina monofosfato cíclica), e está envolvida na regulação da cartilagem de crescimento e crescimento linear. Variantes neste gene estão associadas à Displasia acromesomélica (OMIM 602875), com herança recessiva, Condrodisplasia epifiseal (OMIM 615923) e baixa estatura sem anormalidades esqueléticas (OMIM 616255), ambos com herança autossômica dominante⁽⁷⁸⁾.

Foram encontradas 4 variantes no gene *NPR2*, 1 patogênica (c.1249C>G; p.Gln417Glu), 1 provavelmente patogênica (c.94C>A; p.Pro32Thr) e 2 variantes de significado incerto (c.2356A>T; p.Ile786Phe e c.952C>T; p.Arg318Trp) que necessitam de estudo funcional para melhor elucidar seu papel no fenótipo dos pacientes (Anexo G).

I.I. *NPR2* (c.1249C>G; p.Gln417Glu)

Foi encontrada em uma paciente do sexo feminino, de descendência japonesa, nascida a termo com CN 46 cm (Z= -2,5) e PN 2600g (Z= -1,8), filha única de pais de altura dentro da normalidade. Esteve em acompanhamento pelo ambulatório desde os 10,6 anos de idade quando apresentava altura de 128,2 cm (Z= -1,7), perdeu o acompanhamento aos 15,5 anos com altura adulta de 149,5 cm (Z= -2,1). Clinicamente não apresentava estigmas além da baixa

estatura. Exames laboratoriais de rotina, incluindo dosagens de IGF-1, IGFBP-3 e pico de GH, foram normais.

Esta variante é ausente no 1000 genomas, Abraom e no GnomAD (PM2), não é predita como patogênica *in silico* (n=1/7) (BP4), porém altera um aminoácido conservado da proteína. Pelo gene *NPR2* ser associado com baixa estatura proporcional sem anormalidades esqueléticas, o achado é compatível com a caracterização fenotípica da paciente descrita (PP4). Além disso, esta variante já foi descrita como patogênica associada à baixa estatura em um paciente japonês (PS1). Estudo funcional concluiu que esta variante promove uma redução na habilidade de geração de cGMP dependente de Peptídeo natriurético tipo-C com efeito dominante negativo sobre o receptor normal⁽⁷⁹⁾. Esta perda de função provavelmente se deve por alteração na interação com ligante ou na capacidade de ativação do receptor, já que Gln417 fica localizado na região de junção entre o domínio de interação com ligantes e o domínio transmembrana⁽⁷⁹⁾ (PS3). A classificação pelo guia foi concluída como patogênica

I.II. *NPR2* (c.94C>A;p.Pro32Thr)

A segunda variante foi identificada em uma paciente do sexo feminino, nascida a termo de pai com altura normal e mãe baixa (Z de altura = -2,9). A paciente nasceu com PN 3310 g (Z=-0,2) e CN 46 cm (Z=-2,5). Aos 2,2 anos, apresentava 73 cm de altura (Z=-4,3) e 7,8 kg (Z do IMC=-1,7). Além da baixa estatura, apresentava apenas uma face triangular e fronte proeminente.

Apresentou também um leve atraso do DNPM, andou com 2 anos e desenvolveu fala a partir dos 2,5 anos.

A variante encontrada tem frequência nula em todos os bancos analisados (PM2). A predição *in silico* caracteriza patogenicidade (n=6/7) (PP3) e pelo gene ser descrito associado à baixa estatura proporcional, pode explicar o fenótipo do paciente (PP4). A segregação nos pais confirmou a variante como herdada da mãe também baixa (PP1). E também já existe descrição de patogenicidade no Clinvar (PS1). Portanto foi classificada como provavelmente patogênica.

II. Gene FGFR3

O gene *FGFR3*, codifica o receptor para os fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs), os quais são responsáveis por diversas atividades celulares, incluindo a mutagênese, angiogênese, embriogênese e até mesmo cicatrização^(80, 81).

Variantes ganho de função no *FGFR3* são predominantemente responsáveis por distúrbios dos ossos longos, incluindo a Acondroplasia (OMIM 100800), a forma mais comum de nanismo com comprometimento esquelético⁽⁸²⁾. A Acondroplasia é característica por baixa estatura com encurtamento dos membros, hipoplasia central da face e fronte olímpica, *genu varum*, lordose, e dedos da mão em tridente^(81, 82).

Uma variante no *FGFR3* (c.1138G>A;p.Gly380Arg) em heterozigose foi encontrada em 2 pacientes deste estudo.

II.I. *FGFR3* (c.1138G>A;p.Gly380Arg)

A variante *missense*, c.1138G>A;p.Gly380Arg, localizada no exon 9 do gene *FGFR3*, foi encontrada em 2 pacientes do sexo feminino da casuística que apresentavam suspeita clínica de Acondroplasia.

A primeira paciente é filha de pais com altura normal, nasceu com PN 2770 g (Z=-0,9) e CN 44 cm (Z=-3,2). Aos 2,5 anos apresentava 76,5 cm de altura (Z=-3,5) e 11,5 kg (Z do IMC=2,2). Clinicamente, apresentava rizomelia.

A segunda paciente também é filha de pais com altura normal, nasceu com PN 3140 g (Z=-0,7) e CN 47 cm (Z=-2,2). Aos 1,1 anos apresentava 66 cm de altura (Z=-3,2) e 7,4 kg com IMC dentro da normalidade. Clinicamente apresentava como estigmas desproporção crânio-torácica, baixa implantação de orelhas, cílios longos, palato ogival, fronte olímpica, dedos da mão em tridente, base nasal achatada, e encurtamento rizomélico dos membros superiores e inferiores.

A variante encontrada foi considerada patogênica pelas seguintes evidências, ausência nos bancos populacionais estudados (PM2), apresentar efeito deletério na maioria dos modelos *in silico* (n=4/7) (PP3), ser uma variante recorrente associada a acondroplasia⁽⁸²⁾ (PS1), existir estudo funcional mostrando efeito deletério⁽⁸³⁾ (PS3) e explicar o fenótipo das pacientes (PP4).

III. Gene *SHOX*

O *SHOX* é um gene localizado na região pseudoautossômica dos cromossomos sexuais⁽⁸⁴⁾. A proteína SHOX participa do ciclo de vida dos condrócitos⁽⁸⁵⁾, agindo com um fator de transcrição nas células osteogênicas.

Mutações na região codificadora do *SHOX*, são responsáveis por um espectro fenotípico variável⁽⁸⁶⁾. Quando em homozigose responsável pela Displasia mesomélica de Langer (OMIM 249700) e em heterozigose pela baixa estatura idiopática (OMIM 300582) ou discondrosteose de Léri-Weill (OMIM 127300)⁽⁸²⁾.

III.I. *SHOX*: c.503G>A;p.Arg168Gln

A variante *missense* encontrada no painel, é localizada no exon 4 do *SHOX*, e foi encontrada em um paciente do sexo masculino, nascido a termo, de mãe com altura normal e pai com altura no limite inferior da normalidade (Z = -1,9).

O paciente nasceu com PN 3200g (Z = -0.4) e CN 46 cm (Z = -2.5). Aos 7 anos, apresentava 108,4 cm de altura (Z = -3,5) e peso de 18,7 Kg (Z do IMC = 0,2). Não apresentava nenhum outro estigma além da baixa estatura.

A variante encontrada foi classificada como provavelmente patogênica, pois é ausente nos bancos de dados estudados (PM2), é localizada em região *hotspot* para variantes patogênicas (*homeodomain*) (PM1), existe descrição de variantes diferentes no mesmo aminoácido como deletérias (PM5)⁽⁸⁷⁾, variantes *missense* neste gene são mecanismo de doença (PP2), os modelos *in silico* predizem efeito deletério, n= 7/7 (PP3). A segregação familiar sugere que a variante foi herdada da mãe de altura normal, mas presente em mosaicismo (Figura 7).

Figura 7. Eletroferograma do sequenciamento por Sanger da variante SHOX: c. 503G>A;p.Arg168Gln. Acima DNA controle, abaixo do paciente, seguido por DNA do pai e mãe. Acredita-se que a mãe apresente a variante em mosaicism, pois quando comparados os eletroferogramas podemos observar uma intensidade diferente dos espectros capturados dos nucleotídeos G e A entre mãe e filho.

4.4.5 Síndrome dos genes contíguos

I. Microdeleção cromossômica 22q11

A monossomia da região 22q11 é associada a síndrome de DiGeorge^(88, 89), uma doença que leva a malformações características como dismorfismos faciais e esqueléticos, problemas cardíacos e atraso de desenvolvimento⁽⁸⁹⁾.

A análise do número de cópias do sequenciamento encontrou uma deleção em heterozigose de 3 genes no cromossomo 22 (*DGCR8*, *TBX1* e *LZTR1*) (Figura 8), estes genes estão compreendidos na região mais comum de deleção do cromossomo 22 (22q11). Foi confirmado a deleção através da técnica de MLPA.

O paciente é filho de pais com altura normal, nasceu a termo com PN 2660 g ($Z = -1,2$) e CN 43 cm ($Z = -3,8$). Aos 9 anos apresentava 118,5 cm de altura ($Z = -2,2$) e peso 21,4 kg ($Z = -0,6$). Clinicamente foi avaliado como sindrômico, porém sem diagnóstico específico. Apresentava microcefalia, má oclusão dentária, tetralogia de Fallot, criptorquidia bilateral, escoliose, atraso do DNPM, camptodactilia, dismorfismos faciais com boca grande e filtro apagado. Dentre outras deformidades, apresentou deformidade torácica, hérnia umbilical e encurtamento de tendão.

A deleção foi classificada como patogênica, pois a deleção desta região do cromossomo 22 incluindo estes genes é descrita como patogênica^(88, 89).

Figura 8. Gráfico gerado pela análise do número de cópias pelo CONTRA, mostrando uma deleção no cromossomo 22 (pontos verdes indicados pela seta).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A baixa estatura durante a infância é uma das principais razões para procura de endocrinologistas pediátricos. Nas últimas duas décadas, o avanço da tecnologia permitiu a melhor compreensão dos mecanismos genéticos associados ao crescimento, com um número expressivo de novas causas monogênicas de baixa estatura⁽⁹⁰⁾. Desta forma, o diagnóstico molecular tem ganhado importância tanto para a indicação do melhor tratamento e segmento do paciente, assim como para o aconselhamento genético⁽⁹¹⁾. Com o uso do sequenciamento paralelo em larga escala através de um painel de genes candidatos, foram avaliadas 80 crianças nascidas pequenas para idade gestacional (PIG), que não apresentaram recuperação espontânea do crescimento até o segundo ano de vida. Este grupo de crianças reflete a diversidade de condições associadas a este quadro clínico, compreendendo pacientes sem fenótipo específico assim como pacientes sindrômicos com ou sem diagnóstico clínico. Tivemos resultado positivo em 23,75% dos casos, o que comprova a eficácia da técnica utilizada para realizar o diagnóstico molecular de crianças PIG, mesmo em um cenário de heterogeneidade genética. Este resultado incluiu três diagnósticos de CNVs, duas deleções no *BLM* e a deleção 22q11, mostrando a eficácia desta técnica no reconhecimento deste tipo de variante. Esta taxa está dentro do esperado para estudos que utilizam o sequenciamento paralelo em larga escala, compreendendo tanto o sequenciamento exômico quanto o de painéis com genes alvo, para diagnóstico molecular. Na literatura encontramos valores entre 2% e 34% de taxa de

positividade para avaliação molecular da baixa estatura por meio desta tecnologia⁽⁵⁰⁻⁵³⁾.

Pudemos observar uma maior taxa de positividade em pacientes com diagnóstico clínico sindrômico (44,1%) quando comparados aos casos não sindrômicos (8,7%). E isto pode ser explicado por alguns fatores: (I) os fenótipos extremos que compõem condições sindrômicas tiveram suas bases genéticas mais elucidadas e na sua quase totalidade compreendem condições monogênicas⁽⁹²⁾, (II) por outro lado, a causa da baixa estatura sem outros fenótipos característicos ainda é motivo de discussão, com poucos genes associados e possibilidade de envolver múltiplos locus com interação com fatores ambientais e epigenéticos.

Dos 17 pacientes sindrômicos com suspeita clínica prévia, pudemos estabelecer o diagnóstico molecular em 11 (59%), o que mostra a eficiência da técnica utilizada para confirmação do diagnóstico clínico em pacientes com fenótipos de síndromes bem reconhecidas.

Dos 17 pacientes sindrômicos sem suspeita clínica específica, foi possível estabelecer o diagnóstico em 3 (17,6%), dois deles apresentaram variantes *nonsense* no *ANKRD11*, associado a síndrome de KBG. Esta síndrome é muito rara, com apenas 80 casos descritos na literatura⁽⁹³⁾. E pode ser pela falta de contato dos médicos com essa síndrome que foi difícil estabelecer o diagnóstico clínico.

Um paciente teve o diagnóstico clínico de síndrome de Silver-Russel, porém o estudo da metilação da região 11p15 ICR1 foi normal. Neste paciente

encontramos uma variante no *IGF1R* (c.202G>T;p.Glu68*) que justifica uma resistência parcial aos IGFs e que apresenta características clínicas semelhantes à síndrome de Silver-Russel, como face triangular e baixo peso. É possível que a sobreposição de características destas duas condições e grande variabilidade clínica relacionada com os defeitos no *IGF1R* tenha dificultado o diagnóstico clínico. Os valores de IGF-1 e IGFBP3 do paciente estavam no limite superior da normalidade. Normalmente pacientes com defeitos no *IGF1R* apresentavam concentrações elevadas deste hormônio, principalmente durante o tratamento com rhGH^[64]. O paciente apresentava baixo peso (escore-Z do IMC -3,5), e apesar de não termos identificado outros sinais de desnutrição, podemos inferir que uma nutrição sub ótima podem justificar a “normalização” dos valores do IGF-1 observados neste paciente⁽⁶⁴⁾. Apenas esta variante patogênica no sistema IGFs/IGF1R foi encontrada no presente estudo. Considerando apenas os pacientes sem suspeita clínica inicial (n = 63), a frequência de defeitos neste eixo foi de 1,6%, sugerindo que variantes que comprometem o sistema IGFs/IGF1R não são causa frequente de crianças nascidas PIG. O que corresponde ao encontrado na literatura, onde estudos estimam uma taxa de até 3% de defeitos genéticos neste sistema como causa molecular para crianças nascidas PIG⁽³²⁾. Um único estudo avaliou 100 crianças PIG e encontrou duas variantes no *IGF1R* em 2 pacientes (2%)⁽³⁶⁾.

Dos 46 pacientes não-sindrômicos analisados, 4 tiveram diagnóstico molecular positivo, sendo que 3 deles envolveram genes da cartilagem de crescimento (*NPR2* e *SHOX*). Dois pacientes apresentaram variantes no *NPR2* (2,5%), gene associado à baixa estatura proporcional sem anormalidades

esquelética quando no estado dominante^(78, 79, 94). O que foi compatível com a clínica dos pacientes e com estudos que identificaram entre 1,9% e 12,7% de variantes neste gene associados à baixa estatura idiopática^(86, 94, 95). Variantes em heterozigose no *SHOX* explicam de 2% a 15% dos casos de baixa estatura idiopática de acordo com estudos na literatura^(26, 86, 87, 96), podendo incluir pacientes nascidos pequenos para idade gestacional. Estes achados demonstram uma tendência observada na literatura recente de identificar defeitos em genes envolvidos no desenvolvimento da cartilagem de crescimento que causam quadros inespecíficos de baixa estatura sem caracterizar uma displasia esquelética típica^(47, 94, 97, 98).

Uma variante foi encontrada no *PTPN11*, em um paciente sem suspeita clínica para SN. Porém a variante aqui encontrada (c.794G>A:p.Arg265Gln) tem estudo funcional na literatura, mostrando ganho de função com aumento da atividade catalítica da tirosina fosfatase e hiperativação da via RAS/MAPK⁽⁶⁷⁾. Além disso, pacientes com esta variante foram descritos por apresentarem graus mais leves da SN, com menor frequência de doenças cardíacas e características faciais leves ou imperceptíveis para associação com a SN⁽⁶⁷⁾.

A variante considerada um achado acidental no gene *SMARCA4*, foi assim classificada, pois apenas variantes *missense* neste gene estão associadas à síndrome de Coffin-Síris (SCS - OMIM 614609), uma doença de herança autossômica dominante, que tem como uma de suas características fenotípicas baixa estatura e retardo de crescimento intrauterino. Porém variantes que causam perda completa de função da proteína (LoF), como ganho de stop códon, estão associadas à síndrome de predisposição de tumor de rabdóide

(OMIM 613325), que leva a predisposição de câncer, sem fenótipo de baixa estatura associado⁽⁹⁹⁾. Infelizmente, não foi possível reavaliar o paciente e seus familiares para esta condição.

Dois genes foram selecionados como gene de interesse (*PIK3CA* e *IGFBP3*), pois são genes pertencentes a vias essenciais para regulação do crescimento como a sinalização de receptores tirosinaquinase via AKT/PKB-mTOR e o eixo GH-IGFs, respectivamente^(100, 101). A variante no *PIK3CA* é predita para alteração de sítio de *splicing*, e variantes perda de função neste gene são intoleradas (pLI Exac = 1). Porém variantes nestes genes nunca foram associados à baixa estatura de início pré-natal, e estudos funcionais poderiam indicar um possível efeito deletério.

Mostramos também a relevância do diagnóstico molecular para o tratamento da baixa estatura de pacientes com defeitos em genes essenciais de reparo do DNA, como o *BLM*, no qual variantes levam a predisposição a células tumorais e consequentemente o tratamento com o hormônio recombinante de crescimento humano é contra indicado⁽⁵⁵⁾.

A tecnologia do sequenciamento paralelo em larga escala tem grande potencial para a evolução da compreensão dos fatores genéticos que influenciam no crescimento, por apresentar rapidez e custo reduzido^(51, 90, 92, 102). O uso desta tecnologia por meio de um painel de genes nos permite investigar geneticamente tanto pacientes com fenótipos complexos reconhecidos clinicamente como pacientes sem suspeita clínica específica. Assim como, é eficaz no reconhecimento de variantes em nucleotídeo único (SNPs) e também

variantes no número de cópias (CNVs), isto tudo em apenas um único experimento. Esta tecnologia também possui um sistema de análise dos resultados mais automatizado quando comparado as outras técnicas de análise de variantes como Sanger, MLPA e CGHa. Isto diminui o tempo dispendido de trabalho, e o preço associado ao diagnóstico por paciente. Apesar dessas vantagens, essa tecnologia ainda gera um grande número de dados que permanece como de significado incerto que dependem de mais estudos, incluindo estudos funcionais. A colaboração e o compartilhamento de dados entre pesquisadores poderiam ajudar na compreensão destas variantes.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A técnica de sequenciamento paralelo em larga escala utilizada por meio de painéis contendo os genes associados ao retardo de crescimento pré-natal, foi eficaz em estabelecer o diagnóstico etiológico do distúrbio de crescimento em 23,75% dos pacientes estudados.

Pacientes com quadro sindrômicos, principalmente aqueles com suspeita clínica prévia, apresentam maior sucesso no diagnóstico molecular por meio do sequenciamento de painéis de genes.

Ademais, podemos concluir que variantes no sistema IGFs/IGF1R não são causa frequente de crianças nascidas PIG sem recuperação do crescimento na vida pós-natal, ocorrendo em aproximadamente em 1,6% destes pacientes na nossa casuística.

7 ANEXOS

ANEXO A

Tabela contendo todos os genes incluídos no painel Sure Select para sequenciamento dos genes alvo em crianças nascidas PIG, sem recuperação espontânea de crescimento na vida pós-natal.

Genes da via IGF+/IGF1R	IGF1	IGF2	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	ITGAV	ITGFB	ITGFB2	ITGFB3	ITGFB4	ITGFB5	ITGFB6	ITGFB7	ITGFB8	ITGFB9	ITGFB10	ITGFB11	ITGFB12	ITGFB13	ITGFB14	ITGFB15	ITGFB16	ITGFB17	ITGFB18	ITGFB19	ITGFB20	ITGFB21	ITGFB22	ITGFB23	ITGFB24	ITGFB25	ITGFB26	ITGFB27	ITGFB28	ITGFB29	ITGFB30	ITGFB31	ITGFB32	ITGFB33	ITGFB34	ITGFB35	ITGFB36	ITGFB37	ITGFB38	ITGFB39	ITGFB40	ITGFB41	ITGFB42	ITGFB43	ITGFB44	ITGFB45	ITGFB46	ITGFB47	ITGFB48	ITGFB49	ITGFB50	ITGFB51	ITGFB52	ITGFB53	ITGFB54	ITGFB55	ITGFB56	ITGFB57	ITGFB58	ITGFB59	ITGFB60	ITGFB61	ITGFB62	ITGFB63	ITGFB64	ITGFB65	ITGFB66	ITGFB67	ITGFB68	ITGFB69	ITGFB70	ITGFB71	ITGFB72	ITGFB73	ITGFB74	ITGFB75	ITGFB76	ITGFB77	ITGFB78	ITGFB79	ITGFB80	ITGFB81	ITGFB82	ITGFB83	ITGFB84	ITGFB85	ITGFB86	ITGFB87	ITGFB88	ITGFB89	ITGFB90	ITGFB91	ITGFB92	ITGFB93	ITGFB94	ITGFB95	ITGFB96	ITGFB97	ITGFB98	ITGFB99	ITGFB100	ITGFB101	ITGFB102	ITGFB103	ITGFB104	ITGFB105	ITGFB106	ITGFB107	ITGFB108	ITGFB109	ITGFB110	ITGFB111	ITGFB112	ITGFB113	ITGFB114	ITGFB115	ITGFB116	ITGFB117	ITGFB118	ITGFB119	ITGFB120	ITGFB121	ITGFB122	ITGFB123	ITGFB124	ITGFB125	ITGFB126	ITGFB127	ITGFB128	ITGFB129	ITGFB130	ITGFB131	ITGFB132	ITGFB133	ITGFB134	ITGFB135	ITGFB136	ITGFB137	ITGFB138	ITGFB139	ITGFB140	ITGFB141	ITGFB142	ITGFB143	ITGFB144	ITGFB145	ITGFB146	ITGFB147	ITGFB148	ITGFB149	ITGFB150	ITGFB151	ITGFB152	ITGFB153	ITGFB154	ITGFB155	ITGFB156	ITGFB157	ITGFB158	ITGFB159	ITGFB160	ITGFB161	ITGFB162	ITGFB163	ITGFB164	ITGFB165	ITGFB166	ITGFB167	ITGFB168	ITGFB169	ITGFB170	ITGFB171	ITGFB172	ITGFB173	ITGFB174	ITGFB175	ITGFB176	ITGFB177	ITGFB178	ITGFB179	ITGFB180	ITGFB181	ITGFB182	ITGFB183	ITGFB184	ITGFB185	ITGFB186	ITGFB187	ITGFB188	ITGFB189	ITGFB190	ITGFB191	ITGFB192	ITGFB193	ITGFB194	ITGFB195	ITGFB196	ITGFB197	ITGFB198	ITGFB199	ITGFB200	ITGFB201	ITGFB202	ITGFB203	ITGFB204	ITGFB205	ITGFB206	ITGFB207	ITGFB208	ITGFB209	ITGFB210	ITGFB211	ITGFB212	ITGFB213	ITGFB214	ITGFB215	ITGFB216	ITGFB217	ITGFB218	ITGFB219	ITGFB220	ITGFB221	ITGFB222	ITGFB223	ITGFB224	ITGFB225	ITGFB226	ITGFB227	ITGFB228	ITGFB229	ITGFB230	ITGFB231	ITGFB232	ITGFB233	ITGFB234	ITGFB235	ITGFB236	ITGFB237	ITGFB238	ITGFB239	ITGFB240	ITGFB241	ITGFB242	ITGFB243	ITGFB244	ITGFB245	ITGFB246	ITGFB247	ITGFB248	ITGFB249	ITGFB250	ITGFB251	ITGFB252	ITGFB253	ITGFB254	ITGFB255	ITGFB256	ITGFB257	ITGFB258	ITGFB259	ITGFB260	ITGFB261	ITGFB262	ITGFB263	ITGFB264	ITGFB265	ITGFB266	ITGFB267	ITGFB268	ITGFB269	ITGFB270	ITGFB271	ITGFB272	ITGFB273	ITGFB274	ITGFB275	ITGFB276	ITGFB277	ITGFB278	ITGFB279	ITGFB280	ITGFB281	ITGFB282	ITGFB283	ITGFB284	ITGFB285	ITGFB286	ITGFB287	ITGFB288	ITGFB289	ITGFB290	ITGFB291	ITGFB292	ITGFB293	ITGFB294	ITGFB295	ITGFB296	ITGFB297	ITGFB298	ITGFB299	ITGFB300	ITGFB301	ITGFB302	ITGFB303	ITGFB304	ITGFB305	ITGFB306	ITGFB307	ITGFB308	ITGFB309	ITGFB310	ITGFB311	ITGFB312	ITGFB313	ITGFB314	ITGFB315	ITGFB316	ITGFB317	ITGFB318	ITGFB319	ITGFB320	ITGFB321	ITGFB322	ITGFB323	ITGFB324	ITGFB325	ITGFB326	ITGFB327	ITGFB328	ITGFB329	ITGFB330	ITGFB331	ITGFB332	ITGFB333	ITGFB334	ITGFB335	ITGFB336	ITGFB337	ITGFB338	ITGFB339	ITGFB340	ITGFB341	ITGFB342	ITGFB343	ITGFB344	ITGFB345	ITGFB346	ITGFB347	ITGFB348	ITGFB349	ITGFB350	ITGFB351	ITGFB352	ITGFB353	ITGFB354	ITGFB355	ITGFB356	ITGFB357	ITGFB358	ITGFB359	ITGFB360	ITGFB361	ITGFB362	ITGFB363	ITGFB364	ITGFB365	ITGFB366	ITGFB367	ITGFB368	ITGFB369	ITGFB370	ITGFB371	ITGFB372	ITGFB373	ITGFB374	ITGFB375	ITGFB376	ITGFB377	ITGFB378	ITGFB379	ITGFB380	ITGFB381	ITGFB382	ITGFB383	ITGFB384	ITGFB385	ITGFB386	ITGFB387	ITGFB388	ITGFB389	ITGFB390	ITGFB391	ITGFB392	ITGFB393	ITGFB394	ITGFB395	ITGFB396	ITGFB397	ITGFB398	ITGFB399	ITGFB400	ITGFB401	ITGFB402	ITGFB403	ITGFB404	ITGFB405	ITGFB406	ITGFB407	ITGFB408	ITGFB409	ITGFB410	ITGFB411	ITGFB412	ITGFB413	ITGFB414	ITGFB415	ITGFB416	ITGFB417	ITGFB418	ITGFB419	ITGFB420	ITGFB421	ITGFB422	ITGFB423	ITGFB424	ITGFB425	ITGFB426	ITGFB427	ITGFB428	ITGFB429	ITGFB430	ITGFB431	ITGFB432	ITGFB433	ITGFB434	ITGFB435	ITGFB436	ITGFB437	ITGFB438	ITGFB439	ITGFB440	ITGFB441	ITGFB442	ITGFB443	ITGFB444	ITGFB445	ITGFB446	ITGFB447	ITGFB448	ITGFB449	ITGFB450	ITGFB451	ITGFB452	ITGFB453	ITGFB454	ITGFB455	ITGFB456	ITGFB457	ITGFB458	ITGFB459	ITGFB460	ITGFB461	ITGFB462	ITGFB463	ITGFB464	ITGFB465	ITGFB466	ITGFB467	ITGFB468	ITGFB469	ITGFB470	ITGFB471	ITGFB472	ITGFB473	ITGFB474	ITGFB475	ITGFB476	ITGFB477	ITGFB478	ITGFB479	ITGFB480	ITGFB481	ITGFB482	ITGFB483	ITGFB484	ITGFB485	ITGFB486	ITGFB487	ITGFB488	ITGFB489	ITGFB490	ITGFB491	ITGFB492	ITGFB493	ITGFB494	ITGFB495	ITGFB496	ITGFB497	ITGFB498	ITGFB499	ITGFB500	ITGFB501	ITGFB502	ITGFB503	ITGFB504	ITGFB505	ITGFB506	ITGFB507	ITGFB508	ITGFB509	ITGFB510	ITGFB511	ITGFB512	ITGFB513	ITGFB514	ITGFB515	ITGFB516	ITGFB517	ITGFB518	ITGFB519	ITGFB520	ITGFB521	ITGFB522	ITGFB523	ITGFB524	ITGFB525	ITGFB526	ITGFB527	ITGFB528	ITGFB529	ITGFB530	ITGFB531	ITGFB532	ITGFB533	ITGFB534	ITGFB535	ITGFB536	ITGFB537	ITGFB538	ITGFB539	ITGFB540	ITGFB541	ITGFB542	ITGFB543	ITGFB544	ITGFB545	ITGFB546	ITGFB547	ITGFB548	ITGFB549	ITGFB550	ITGFB551	ITGFB552	ITGFB553	ITGFB554	ITGFB555	ITGFB556	ITGFB557	ITGFB558	ITGFB559	ITGFB560	ITGFB561	ITGFB562	ITGFB563	ITGFB564	ITGFB565	ITGFB566	ITGFB567	ITGFB568	ITGFB569	ITGFB570	ITGFB571	ITGFB572	ITGFB573	ITGFB574	ITGFB575	ITGFB576	ITGFB577	ITGFB578	ITGFB579	ITGFB580	ITGFB581	ITGFB582	ITGFB583	ITGFB584	ITGFB585	ITGFB586	ITGFB587	ITGFB588	ITGFB589	ITGFB590	ITGFB591	ITGFB592	ITGFB593	ITGFB594	ITGFB595	ITGFB596	ITGFB597	ITGFB598	ITGFB599	ITGFB600	ITGFB601	ITGFB602	ITGFB603	ITGFB604	ITGFB605	ITGFB606	ITGFB607	ITGFB608	ITGFB609	ITGFB610	ITGFB611	ITGFB612	ITGFB613	ITGFB614	ITGFB615	ITGFB616	ITGFB617	ITGFB618	ITGFB619	ITGFB620	ITGFB621	ITGFB622	ITGFB623	ITGFB624	ITGFB625	ITGFB626	ITGFB627	ITGFB628	ITGFB629	ITGFB630	ITGFB631	ITGFB632	ITGFB633	ITGFB634	ITGFB635	ITGFB636	ITGFB637	ITGFB638	ITGFB639	ITGFB640	ITGFB641	ITGFB642	ITGFB643	ITGFB644	ITGFB645	ITGFB646	ITGFB647	ITGFB648	ITGFB649	ITGFB650	ITGFB651	ITGFB652	ITGFB653	ITGFB654	ITGFB655	ITGFB656	ITGFB657	ITGFB658	ITGFB659	ITGFB660	ITGFB661	ITGFB662	ITGFB663	ITGFB664	ITGFB665	ITGFB666	ITGFB667	ITGFB668	ITGFB669	ITGFB670	ITGFB671	ITGFB672	ITGFB673	ITGFB674	ITGFB675	ITGFB676	ITGFB677	ITGFB678	ITGFB679	ITGFB680	ITGFB681	ITGFB682	ITGFB683	ITGFB684	ITGFB685	ITGFB686	ITGFB687	ITGFB688	ITGFB689	ITGFB690	ITGFB691	ITGFB692	ITGFB693	ITGFB694	ITGFB695	ITGFB696	ITGFB697	ITGFB698	ITGFB699	ITGFB700	ITGFB701	ITGFB702	ITGFB703	ITGFB704	ITGFB705	ITGFB706	ITGFB707	ITGFB708	ITGFB709	ITGFB710	ITGFB711	ITGFB712	ITGFB713	ITGFB714	ITGFB715	ITGFB716	ITGFB717	ITGFB718	ITGFB719	ITGFB720	ITGFB721	ITGFB722	ITGFB723	ITGFB724	ITGFB725	ITGFB726	ITGFB727	ITGFB728	ITGFB729	ITGFB730	ITGFB731	ITGFB732	ITGFB733	ITGFB734	ITGFB735	ITGFB736	ITGFB737	ITGFB738	ITGFB739	ITGFB740	ITGFB741	ITGFB742	ITGFB743	ITGFB744	ITGFB745	ITGFB746	ITGFB747	ITGFB748	ITGFB749	ITGFB750	ITGFB751	ITGFB752	ITGFB753	ITGFB754	ITGFB755	ITGFB756	ITGFB757	ITGFB758	ITGFB759	ITGFB760	ITGFB761	ITGFB762	ITGFB763	ITGFB764	ITGFB765	ITGFB766	ITGFB767	ITGFB768	ITGFB769	ITGFB770	ITGFB771	ITGFB772	ITGFB773	ITGFB774	ITGFB775	ITGFB776	ITGFB777	ITGFB778	ITGFB779	ITGFB780	ITGFB781	ITGFB782	ITGFB783	ITGFB784	ITGFB785	ITGFB786	ITGFB787	ITGFB788	ITGFB789	ITGFB790	ITGFB791	ITGFB792	ITGFB793	ITGFB794	ITGFB795	ITGFB796	ITGFB797	ITGFB798	ITGFB799	ITGFB800	ITGFB801	ITGFB802	ITGFB803	ITGFB804	ITGFB805	ITGFB806	ITGFB807	ITGFB808	ITGFB809	ITGFB810	ITGFB811	ITGFB812	ITGFB813	ITGFB814	ITGFB815	ITGFB816	ITGFB817	ITGFB818	ITGFB819	ITGFB820	ITGFB821	ITGFB822	ITGFB823	ITGFB824	ITGFB825	ITGFB826	ITGFB827	ITGFB828	ITGFB829	ITGFB830	ITGFB831	ITGFB832	ITGFB833	ITGFB834	ITGFB835	ITGFB836	ITGFB837	ITGFB838	ITGFB839	ITGFB840	ITGFB841	ITGFB842	ITGFB843	ITGFB844	ITGFB845	ITGFB846	ITGFB847	ITGFB848	ITGFB849	ITGFB850	ITGFB851	ITGFB852	ITGFB853	ITGFB854	ITGFB855	ITGFB856	ITGFB857	ITGFB858	ITGFB859	ITGFB860	ITGFB861	ITGFB862	ITGFB863	ITGFB864	ITGFB865	ITGFB866	ITGFB867	ITGFB868	ITGFB869	ITGFB870	ITGFB871	ITGFB872	ITGFB873	ITGFB874	ITGFB875	ITGFB876	ITGFB877	ITGFB878	ITGFB879	ITGFB880	ITGFB881	ITGFB882	ITGFB883	ITGFB884	ITGFB885	ITGFB886	ITGFB887	ITGFB888	ITGFB889	ITGFB890	ITGFB891	ITGFB892	ITGFB893	ITGFB894	ITGFB895	ITGFB896	ITGFB897	ITGFB898	ITGFB899	ITGFB900	ITGFB901	ITGFB902	ITGFB903	ITGFB904	ITGFB905	ITGFB906	ITGFB907	ITGFB908	ITGFB909	ITGFB910	ITGFB911	ITGFB912	ITGFB913	ITGFB914	ITGFB915	ITGFB916	ITGFB917	ITGFB918	ITGFB919	ITGFB920	ITGFB921	ITGFB922	ITGFB923	ITGFB924	ITGFB925	ITGFB926	ITGFB927	ITGFB928	ITGFB929	ITGFB930	ITGFB931	ITGFB932	ITGFB933	ITGFB934	ITGFB935	ITGFB936	ITGFB937	ITGFB938	ITGFB939	ITGFB940	ITGFB941	ITGFB942	ITGFB943	ITGFB944	ITGFB945	ITGFB946	ITGFB947	ITGFB948	ITGFB949	ITGFB950	ITGFB951	ITGFB952	ITGFB953	ITGFB954	ITGFB955	ITGFB956	ITGFB957	ITGFB958	ITGFB959	ITGFB960	ITGFB961	ITGFB962	ITGFB963	ITGFB964	ITGFB965	ITGFB966	ITGFB967	ITGFB968	ITGFB969	ITGFB970	ITGFB971	ITGFB972	ITGFB973	ITGFB974	ITGFB975	ITGFB976	ITGFB977	ITGFB978	ITGFB979	ITGFB980	ITGFB981	ITGFB982	ITGFB983	ITGFB984	ITGFB985	ITGFB986	ITGFB987	ITGFB988	ITGFB989	ITGFB990	ITGFB991	ITGFB992	ITGFB993	ITGFB994	ITGFB995	ITGFB996	ITGFB997	ITGFB998	ITGFB999	ITGFB1000	ITGFB1001	ITGFB1002	ITGFB1003	ITGFB1004	ITGFB1005	ITGFB1006	ITGFB1007	ITGFB1008	ITGFB1009	ITGFB1010	ITGFB1011	ITGFB1012	ITGFB1013	ITGFB1014	ITGFB1015	ITGFB1016	ITGFB1017	ITGFB1018	ITGFB1019	ITGFB1020	ITGFB1021	ITGFB1022	ITGFB1023	ITGFB1024	ITGFB1025	ITGFB1026	ITGFB1027	ITGFB1028	ITGFB1029	ITGFB1030	ITGFB1031	ITGFB1032	ITGFB1033	ITGFB1034	ITGFB1035	ITGFB1036	ITGFB1037	ITGFB1038	ITGFB1039	ITGFB1040	ITGFB1041	ITGFB1042	ITGFB1043	ITGFB1044	ITGFB1045	ITGFB1046	ITGFB1047	ITGFB1048	ITGFB1049	ITGFB1050	ITGFB1051	ITGFB1052	ITGFB1053	ITGFB1054	ITGFB1055	ITGFB1056	ITGFB1057	ITGFB1058	ITGFB1059	ITGFB1060	ITGFB1061	ITGFB1062	ITGFB1063	ITGFB1064	ITGFB1065	ITGFB1066	ITGFB1067	ITGFB1068	ITGFB1069	ITGFB1070	ITGFB1071	ITGFB1072	ITGFB1073	ITGFB1074	ITGFB1075	ITGFB1076	ITGFB1077	ITGFB1078	ITGFB1079	ITGFB1080	ITGFB1081	ITGFB1082	ITGFB1083	ITGFB1084	ITGFB1085	ITGFB1086	ITGFB1087	ITGFB1088	ITGFB1089	ITGFB1090	ITGFB1091	ITGFB1092	ITGFB1093	ITGFB1094	ITGFB1095	ITGFB1096	ITGFB1097	ITGFB1098	ITGFB1099	ITGFB1100	ITGFB1101</
-------------------------	------	------	--------	--------	--------	--------	--------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-------------

ANEXO B

Protocolo para avaliação inicial de paciente nascido pequeno para idade gestacional

Paciente: _____ RGHC: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: M () F ()

Altura da Mãe (cm) _____

Altura da Pai (cm) _____

Idade gestacional (sem) _____

APGAR: ____/____

Peso ao nascimento (g) _____

Comprimento ao nascimento (cm) _____

Perim Cef (cm) _____

Complicações na gestação e/ou parto: _____

() – Alcoolismo ou uso de drogas na gestação: _____

() – Infecções na gestação: _____

Data da avaliação: ____ / ____ / ____

Altura (cm): _____ Altura sentada (cm): _____ Envergadura (cm): _____

Peso (kg): _____ Perímetro Cefálico (cm) _____

Triagem para avaliação de quadro sindrômico

() – Consanguinidade: _____

() – Outra(s) mal formações: _____

() – Dismorfismos faciais: _____

() – Microcefalia: _____

() – Deformidade esquelética: _____

() – Desproporção corpórea: _____

() – Atraso no DNPM: _____

() – Retardo mental ou autismo: _____

ANEXO C

Caracterização fenotípica dos pacientes nascidos pequeno para idade gestacional com dismorfismos, que foram classificados como sindrômicos

Facieis

() – Ptose palpebral	() – Alteração na fissura palpebral
() – Rarefação de cílios	() – Cílios longos e curvos
() – Sobrancelhas arqueadas	() – Sobrancelhas unidas
() – Nariz largo	() – Sobrancelhas rarefeitas
() – Nariz estreito	() – Nariz pequeno
() – Filtro curto	() – Bossa frontal
() – Lábios finos	() – Filtro largo
() – Retrognatia	() – Micrognatia
() – Fissura palatina	() – Palato ogival
	() – Orelhas com implantação baixa
() – Orelhas com má rotação	() – Queixo fino
() – Queixo largo	() – Facieis triangular
() – Pescoço curto	
() – Baixa implantação de cabelos	

Cardiovascular

() – Miocardiopatia hipertrófica	() – Coarctação de aorta
() – Estenose de artéria: _____	() – Valvopatia: _____
() – Defeito de septo: _____	

Respiratório

() – Alterações pulmonares: _____	() – Alterações laringotraqueais
() – <i>Pectus carinatum</i>	() – <i>Pectus excavatum</i>

Imunológico

() – Deficiência de imunoglobulinas	() – Suscetibilidade à infecções

Gastrointestinal

() – Constipação	() – Refluxo gastroesofágico
() – Alteração anatômica: _____	() – Organomegalia: _____

Genitourinário

() – Criptorquidia	() – Genitália atípica:
() – Hidronefrose	() – Micropênis
() – Alterações vesicoureterais	

Neuropsicomotor

- () – Atraso global
 () – Atraso motor
 () – Hipotonia
 () – Microcefalia

- () – Dificuldade na fala
 () – Convulsões
 () – Hidrocefalia
 () – Macrocrania

Esquelético

- () – Malformações ósseas
 () – Alterações em ossos longos
 () – Hiperextensibilidade
 () – Mãos pequenas
 () – Pés pequenos

- () – Alterações em coluna
 () – Atraso de idade óssea
 () – Articulações endurecidas
 () – Clinodactilia
 () – Assimetria corpórea

Endócrino

- () – Tireoidopatia
 () – Hipocalcemia/hipercalcemia
 () – Hipogonadismo

- () – Puberdade precoce
 () – Baixa estatura
 () – Outras
 endocrinopatias: _____

Visão

- () – Coloboma
 () – Nistagmo
 () – Alteração visual: _____

- () – Catarata
 () – Hipertelorismo

Audição

- () – Déficit auditivo

- () – Otites de repetição

Pele

- () – Manchas/sinais: _____
 () – Hiperqueratose

- () – Lentigens
 () – Pele atrófica

Hematológico

- () – Alterações hematológicas: _____

- () – Anemia

Neoplasias

- () – Linfoma/leucemia

- () – Outros: _____

Outras medidas antropométricas:

Distância intercantal interna: _____

Distância intercantal externa: _____

Falange média direita: _____

Falange média esquerda: _____

Palma mão direita: _____

Palma mão esquerda: _____

Orelha direita: _____

Orelha esquerda: _____

ANEXO D

Resumo das linhas de evidência utilizadas na classificação pelo guia
ACMG-AMP

	Benigna (B)		Patogênica (P)			
	Forte (S)	Pequena (P)	Pequena (P)	Moderada (M)	Forte (S)	Muito Forte (VS)
Dados populacionais	MAF incompatível com a doença BS1/BA1			Ausente em bancos de dados PM2	Maior prevalência em afetados PS4	
Predição <i>In silico</i>		Sugerem ausência de impacto BP4	Sugerem patogenicidade PP3	Mudança de tamanho da proteína PM4 Nova mudança de aminoácido na mesma posição de uma variante já descrita PM5	Mesma mudança de aminoácido já descrita como patogênica PM5	LOF em gene onde este tipo de variante é deletéria PVS1
Dados funcionais	Estudos mostram ausência de impacto BS3		Não sinônima onde este tipo de variante é conhecido como deletéria PP2		Estudos mostram patogenicidade PS3	
Compatibilidade com fenótipo			Compatível com fenótipo PP4			
Segregação familiar	Não-segrega BS4		Segrega com a família PP1			

ANEXO E

Critérios utilizados para classificação final de patogenicidade segundo o guia
ACMG-AMP

Patogênica	1 PVS1 + 1 PS <i>ou</i> 1 PVS1 + 2 PM <i>ou</i> 1 PVS1 + 1 PM + 1 PP <i>ou</i> 12 PS <i>ou</i> 1 PS + 3 PM <i>ou</i> 1 PS + 2 PM + 2 PP <i>ou</i> 1 PS + 1 PM + 4 PP
Provavelmente patogênica	1 PVS + 1 PM <i>ou</i> 1 PS + 1-2 PM <i>ou</i> 1 PS + 2 PP <i>ou</i> 3 PM <i>ou</i> 2 PM + 2 PP <i>ou</i> 1 PM + 4 PP
Benigna	1 BA1 <i>ou</i> 2 BS
Provavelmente benigna	1 BS + 1 BP <i>ou</i> 2 BP
Variante de significado Incerto	Outro critério não mencionado acima

ANEXO F

Tabela completa da casuística selecionada com as características observadas e mensuradas em avaliação clínica.

Endereço eletrônico: DOI: 10.13140/RG.2.2.16883.22565

ANEXO G

Variantes de interesse classificadas como VUS

Gene	Variante	dbSNP ID	Nº de pacientes	Herança	Fenótipo associado
ARID1B	c.4345G>A; p.Gly1449Ser	rs141461351	1	Dominante	Síndrome de Coffin-siris
ARID1B	c.2230G>T; p.Val744Leu	N.D.	1	Dominante	Síndrome de Coffin-siris
COL2A1	c.4205A>T; p.Glu1402Val	N.D.	1	Dominante	Acondrogênese tipo II
COL9A2	c.339G>A; p.Pro113Pro	rs201859264	1	Dominante	Múltipla displasia epifisial 2
COL9A3	c.77A>T; p.Gln26Leu	N.D.	1	Dominante	Múltipla displasia epifisial 3
EP300	c.4235C>; p.Ala1412Val	N.D.	1	Dominante	Síndrome de Rubinstein-Taybi
EP300	c.3624C>G; p.Ile1208Met	N.D.	1	Dominante	Síndrome de Rubinstein-Taybi
FBN2	c.4374C>A; p.Asn1458Lys	N.D.	1	Dominante	Aracnodactilia contratural congênita
FLNB	c.3655C>T; p.Arg1219Trp	rs763607287	1	Dominante	Síndrome de Larsen
FLNB	c.3476C>T; p.Ser1159Leu	rs201254275	1	Dominante	Síndrome de Larsen
GDF5	c.245C>T; p.Ser82Leu	N.D.	1	Dominante	Braquidactilia
GNAS	c.C2965T; p.Leu989Leu	rs139339859	1	Dominante	Pseudohipoparatiroidismo
IHH	5'UTR [c.-10C>T]	N.D.	1	Dominante	Braquidactilia
IHH	c.128A>G; p.Lys43Arg	rs746341121	1	Dominante	Braquidactilia
NF1	c.6943G>A; p.Ala2315Thr	rs587781428	1	Dominante	Neurofibromatose, tipo 1
NF1	c.169G>A; p.Gly57Ser	rs779727341	1	Dominante	Neurofibromatose, tipo 2
NPR2	c.2356A>T; p.Ile786Phe	rs760234431	1	Dominante	Baixa estatura proporcional
NPR2	c.952C>T; p.Arg318Trp	rs764711038	1	Dominante	Baixa estatura proporcional
ROR2	c.1736A>T; p.Asp579Val	rs150610444	1	Dominante	Braquidactilia
ROR2	c.2789A>T; p.Asp930Val	N.D.	1	Dominante	Braquidactilia
SAMD9	c.866T>A; p.Phe289Tyr	N.D.	2	Dominante	Síndrome de Mirage
SOS1	c.1490G>A; p.Arg497Gln	rs371314838	1	Dominante	Síndrome de Noonan

N.D.: Não descrito

Sequências referências no NCBI: ARID1B (NM_020732); COL2A1 (NM_001844); COL9A2 (NM_001852); COL9A3 (NM_001853); EP300 (NM_001429); FLNB (NM_001457); GDF5 (NM_000557); GNAS (NM_080425); IHH (NM_002181); NF1 (NM_000267); NPR2 (NM_003995); ROR2 (NM_004560); SAMD9 (NM_017654); SOS1 (NM_005633)

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*. 1968;49(1):219-22.
2. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy).]. *Bull Acad Natl Med*. 1959;143(11-12):256-65.
3. Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*. 1959;1(7075):711-3.
4. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*. 1959;183(4657):302-3.
5. den Dunnen JT, White SJ. MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al. 2006;Chapter 7:Unit 7 14.*
6. Funari MF, Jorge AA, Pinto EM, Arnhold IJ, Mendonca BB, Nishi MY. Cryptic intragenic deletion of the SHOX gene in a family with Leri-Weill dyschondrosteosis detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(8):1382-7.
7. Funari MF, Jorge AA, Souza SC, Billerbeck AE, Arnhold IJ, Mendonca BB, et al. Usefulness of MLPA in the detection of SHOX deletions. *Eur J Med Genet*. 2010;53(5):234-8.
8. Trarbach EB, Teles MG, Costa EM, Abreu AP, Garmes HM, Guerra G, Jr., et al. Screening of autosomal gene deletions in patients with hypogonadotropic hypogonadism using multiplex ligation-dependent probe amplification: detection of a hemizygosis for the fibroblast growth factor receptor 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(3):371-6.
9. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-21.
10. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-11.
11. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.
12. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003;300(5617):286-90.
13. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402.
14. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
15. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.

16. Renkema KY, Stokman MF, Giles RH, Knoers NV. Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(8):433-44.
17. Rocha MG, Marchisotti FG, Osorio MG, Marui S, Carvalho LR, Jorge AA, et al. High prevalence of pituitary magnetic resonance abnormalities and gene mutations in a cohort of Brazilian children with growth hormone deficiency and response to treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21(7):673-80.
18. Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, et al. Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4889-92.
19. Jorge AA, Menezes Filho HC, Lins TS, Guedes DR, Damiani D, Setian N, et al. [Founder effect of E180splice mutation in growth hormone receptor gene (GHR) identified in Brazilian patients with GH insensitivity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(3):384-9.
20. Jorge AA, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonca BB. The first homozygous mutation (S226I) in the highly-conserved WSXWS-like motif of the GH receptor causing Laron syndrome: suppression of GH secretion by GnRH analogue therapy not restored by dihydrotestosterone administration. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;60(1):36-40.
21. Besson A, Salemi S, Deladoey J, Vuissoz JM, Eble A, Bidlingmaier M, et al. Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S). *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2493-9.
22. Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, et al. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5076-84.
23. Franca MM, Jorge AA, Alatzoglou KS, Carvalho LR, Mendonca BB, Audi L, et al. Absence of GH-Releasing Hormone (GHRH) Mutations in Selected Patients with Isolated GH Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011.
24. Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):E384-91.
25. Scalco RC, Melo SS, Pugliese-Pires PN, Funari MF, Nishi MY, Arnhold IJ, et al. Effectiveness of the combined recombinant human growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in pubertal patients with short stature due to SHOX deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):328-32.
26. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66(1):130-5.
27. Ferreira LV, Souza SA, Arnhold IJ, Mendonca BB, Jorge AA. PTPN11 (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11) mutations and response to growth hormone therapy in children with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5156-60.
28. Ferreira LV, Souza SC, Montenegro LR, Malaquias AC, Arnhold IJ, Mendonca BB, et al. Analysis of the PTPN11 gene in idiopathic short stature children and Noonan syndrome patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(3):426-31.

29. Malaquias AC, Brasil AS, Pereira AC, Arnhold IJ, Mendonca BB, Bertola DR, et al. Growth standards of patients with Noonan and Noonan-like syndromes with mutations in the RAS/MAPK pathway. *American journal of medical genetics*. 2012.
30. Montenegro LR, Leal AC, Coutinho DC, Valassi HP, Nishi MY, Arnhold IJ, et al. Post-receptor IGF1 insensitivity restricted to the MAPK pathway in a Silver-Russell syndrome patient with hypomethylation at the imprinting control region on chromosome 11. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(3):543-50.
31. Pugliese-Pires PN, Tonelli CA, Dora JM, Silva PC, Czepielewski M, Simoni G, et al. A novel STAT5B mutation causing GH insensitivity syndrome associated with hyperprolactinemia and immune dysfunction in two male siblings. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(2):349-55.
32. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CA, Kant SG. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):R145-73.
33. Walenkamp MJ, Wit JM. Single gene mutations causing SGA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(3):433-46.
34. Begemann M, Zirn B, Santen G, Wirthgen E, Soellner L, Buttel HM, et al. Paternally Inherited IGF2 Mutation and Growth Restriction. *N Engl J Med*. 2015;373(4):349-56.
35. Leal Ade C, Canton AP, Montenegro LR, Coutinho DC, Arnhold IJ, Jorge AA. [Mutations in insulin-like growth factor receptor 1 gene (IGF1R) resulting in intrauterine and postnatal growth retardation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(8):541-9.
36. Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, et al. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4717-27.
37. Leal AC, Montenegro LR, Saito RF, Ribeiro TC, Coutinho DC, Mendonca BB, et al. Analysis of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in children born small for gestational age: in vitro characterization of a novel mutation (p.Arg511Trp). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(4):558-63.
38. Homma TK, Krepschi ACV, Furuya TK, Honjo RS, Malaquias AC, Bertola DR, et al. Recurrent Copy Number Variants Associated with Syndromic Short Stature of Unknown Cause. *Horm Res Paediatr*. 2018;89(1):13-21.
39. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19(3):230-6.
40. Malaquias AC, Brasil AS, Pereira AC, Arnhold IJ, Mendonca BB, Bertola DR, et al. Growth standards of patients with Noonan and Noonan-like syndromes with mutations in the RAS/MAPK pathway. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(11):2700-6.
41. Santen GW, Aten E, Sun Y, Almomani R, Gilissen C, Nielsen M, et al. Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*. 2012;44(4):379-80.
42. Ye B, Liu B, Yang L, Huang G, Hao L, Xia P, et al. Suppression of SRCAP chromatin remodelling complex and restriction of lymphoid lineage commitment by Pcid2. *Nat Commun*. 2017;8(1):1518.

43. Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(6):636-41.
44. Hatkevich T, Kohl KP, McMahan S, Hartmann MA, Williams AM, Sekelsky J. Bloom Syndrome Helicase Promotes Meiotic Crossover Patterning and Homolog Disjunction. *Curr Biol.* 2017;27(1):96-102.
45. Spranger J. Bone dysplasia 'families'. *Pathol Immunopathol Res.* 1988;7(1-2):76-80.
46. Pejchalova K, Krejci P, Wilcox WR. C-natriuretic peptide: an important regulator of cartilage. *Mol Genet Metab.* 2007;92(3):210-5.
47. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical Characterization of Patients With Autosomal Dominant Short Stature due to Aggrecan Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(2):460-9.
48. Maldjian P, Sanders AE. 22q11 Deletion Syndrome with Vascular Anomalies. *J Clin Imaging Sci.* 2018;8:1.
49. Binder G, Seidel AK, Martin DD, Schweizer R, Schwarze CP, Wollmann HA, et al. The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1402-7.
50. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, et al. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1428-37.
51. Guo MH, Shen Y, Walvoord EC, Miller TC, Moon JE, Hirschhorn JN, et al. Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(1):44-52.
52. Nadine N Hauer MSc BPM, Eva Schoeller MSc, Sarah Schuhmann MD, Karen E Heath PhD, Alfonso Hisado-Oliva BSc, Patricia Klinger PhD, Cornelia Kraus PhD, Udo Trautmann PhD, Martin Zenker MD, Christiane Zweier MD, PhD, Antje Wiesener MD, Rami Abou Jamra MD, Erdmute Kunstmann MD, Dagmar Wieczorek MD, Steffen Uebe PhD, Fulvia Ferrazzi PhD, Christian Büttner MSc, Arif B Ekici PhD, Anita Rauch MD, Heinrich Sticht PhD, Helmuth-Günther Dörr MD, André Reis MD & Christian T Thiel MD. Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *GENETICS in MEDICINE.* 12 October 2017.
53. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, et al. Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature. *Endocr J.* 2017;64(10):947-54.
54. Mahmoud R, Naidu A, Risheg H, Kimonis V. Response to Growth Hormone Treatment in a Patient with Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Deletion. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9(4):380-6.
55. Renes JS, Willemsen RH, Wagner A, Finken MJ, Hokken-Koelega AC. Bloom syndrome in short children born small for gestational age: a challenging diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):3932-8.
56. Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr.* 1969;74(6):901-10.

57. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 11. 2002(246):1-190.
58. Silva DA, Pelegrini A, Petroski EL, Gaya AC. Comparison between the growth of Brazilian children and adolescents and the reference growth charts: data from a Brazilian project. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(2):115-20.
59. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
60. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1077-81.
61. Klammt J, Kiess W, Pfaffle R. IGF1R mutations as cause of SGA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):191-206.
62. Fang P, Cho YH, Derr MA, Rosenfeld RG, Hwa V, Cowell CT. Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(2):E243-7.
63. Gannage-Yared MH, Klammt J, Chouery E, Corbani S, Megarbane H, Abou Ghoch J, et al. Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(1):K1-7.
64. Walenkamp MJ, Losekoot M, Wit JM. Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. *Endocr Dev*. 2013;24:128-37.
65. Malaquias AC, Ferreira LV, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonca BB, Jorge AA. [Noonan syndrome: from phenotype to growth hormone therapy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(5):800-8.
66. Keren B, Hadchouel A, Saba S, Sznajer Y, Bonneau D, Leheup B, et al. PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. *J Med Genet*. 2004;41(11):e117.
67. Pannone L, Bocchinfuso G, Flex E, Rossi C, Baldassarre G, Lissewski C, et al. Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel PTPN11 Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Hum Mutat*. 2017;38(4):451-9.
68. Rodriguez-Viciana P, Oses-Prieto J, Burlingame A, Fried M, McCormick F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell*. 2006;22(2):217-30.
69. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet*. 2009;41(9):1022-6.
70. Hood RL, Schenkel LC, Nikkel SM, Ainsworth PJ, Pare G, Boycott KM, et al. The defining DNA methylation signature of Floating-Harbor Syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:38803.
71. Le Goff C, Mahaut C, Bottani A, Doray B, Goldenberg A, Moncla A, et al. Not all floating-harbor syndrome cases are due to mutations in exon 34 of SRCAP. *Hum Mutat*. 2013;34(1):88-92.

72. Cunliffe C, Bassetti JA, Ellis NA. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol Syndromol*. 2017;8(1):4-23.
73. Zhang A, Yeung PL, Li CW, Tsai SC, Dinh GK, Wu X, et al. Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33799-805.
74. Sirmaci A, Spiliopoulos M, Brancati F, Powell E, Duman D, Abrams A, et al. Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual disability, skeletal malformations, and macrodontia. *Am J Hum Genet*. 2011;89(2):289-94.
75. Low K, Ashraf T, Canham N, Clayton-Smith J, Deshpande C, Donaldson A, et al. Clinical and genetic aspects of KBG syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016;170(11):2835-46.
76. Watrin E, Schleiffer A, Tanaka K, Eisenhaber F, Nasmyth K, Peters JM. Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr Biol*. 2006;16(9):863-74.
77. Borck G, Redon R, Sanlaville D, Rio M, Prieur M, Lyonnet S, et al. NIPBL mutations and genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet*. 2004;41(12):e128.
78. Vasques GA, Arnhold IJ, Jorge AA. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(4):222-9.
79. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, et al. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):E713-8.
80. Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(4):1095-9.
81. Monsonego-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yaron A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(2):516-22.
82. Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet*. 1995;56(2):368-73.
83. Ajmal M, Mir A, Shoaib M, Malik SA, Nasir M. Identification and in silico characterization of p.G380R substitution in FGFR3, associated with achondroplasia in a non-consanguineous Pakistani family. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):47.
84. Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, et al. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(35):37103-14.
85. Marchini A, Hacker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, et al. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet*. 2007;16(24):3081-7.
86. Kang MJ. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;22(3):153-7.

87. Binder G, Renz A, Martinez A, Keselman A, Hesse V, Riedl SW, et al. SHOX haploinsufficiency and Leri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4403-8.
88. Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, et al. Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet.* 1992;51(5):964-70.
89. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics.* 2003;112(1 Pt 1):101-7.
90. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):3080-92.
91. Seaver LH, Irons M, American College of Medical Genetics Professional P, Guidelines C. ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genet Med.* 2009;11(6):465-70.
92. Trujillano D, Bertoli-Avella AM, Kumar Kandaswamy K, Weiss ME, Koster J, Marais A, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):176-82.
93. Reynaert N, Ockeloen CW, Savendahl L, Beckers D, Devriendt K, Kleefstra T, et al. Short Stature in KBG Syndrome: First Responses to Growth Hormone Treatment. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(5):361-4.
94. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):E1636-44.
95. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature. *Hum Mutat.* 2015;36(4):474-81.
96. Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm Res Paediatr.* 2011;75(2):81-9.
97. Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, Aza-Carmona M, Sentchordi-Montane L, Barraza-Garcia J, et al. IHH Gene Mutations Causing Short Stature With Nonspecific Skeletal Abnormalities and Response to Growth Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):604-14.
98. Jorge AA, Nishi MY, Funari MF, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonca BB. [Short stature caused by SHOX gene haploinsufficiency: from diagnosis to treatment]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(5):765-73.
99. Jelinic P, Mueller JJ, Olvera N, Dao F, Scott SN, Shah R, et al. Recurrent SMARCA4 mutations in small cell carcinoma of the ovary. *Nat Genet.* 2014;46(5):424-6.
100. Foukas LC, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, et al. Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature.* 2006;441(7091):366-70.
101. Marzano F, Ventura A, Caratozzolo MF, Aiello I, Mastropasqua F, Brunetti G, et al. The p53 family member p73 modulates the proliferative role of IGFBP3 in short children born small for gestational age. *Mol Biol Cell.* 2015;26(15):2733-41.

102. Stark Z, Schofield D, Alam K, Wilson W, Mupfeki N, Macciocca I, et al. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genet Med*. 2017;19(8):867-74.