ANA PINHEIRO MACHADO CANTON

**Variações no número de cópias
cromossômicas submicroscópicas como causa
de baixa estatura de início pré-natal**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima
Jorge

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Canton, Ana Pinheiro Machado

Variações no número de cópias cromossômicas submicroscópicas como causa de baixa estatura de início pré-natal / Ana Pinheiro Machado Canton. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Alexander Augusto de Lima de Jorge.

Descritores: 1.Retardo de crescimento fetal/genética 2.Transtornos do crescimento/diagnóstico 3.Transtornos do crescimento/genética 4.Hibridização genômica comparativa 5.Deleção cromossômica 6.Duplicação cromossômica

USP/FM/DBD-034/15

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (LIM/25), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Sua realização teve colaboração da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, bem como apoio da CAPES com bolsa de doutorado direto demanda social.

DEDICATÓRIA

Aos pacientes, a verdadeira motivação de nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Alex: muito obrigada. Obrigada pelas oportunidades que nos encorajam, pela exigência que nos ensina, pelo aprendizado que nos estimula, pela dedicação que nos motiva, pela paciência que nos apóia e pela amizade que nos abraça. Considero ser sua aluna um grande mérito.

Muito obrigada à Profa. Dra. Berenice Mendonça e ao Dr. Ivo Arnhold. Seus ensinamentos são exemplos contínuos de coerência, persistência, dedicação e sabedoria, tanto na prática clínica quanto na pesquisa. É um grande orgulho para nós, alunos, aprender em seu serviço de Endocrinologia Pediátrica. Sou também grata à Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico por seus ensinamentos e por seu importante apoio ao nosso trabalho.

Meu muito obrigada à Profa. Dra. Carla Rosenberg pela fundamental colaboração e pela oportunidade para realização deste trabalho, bem como pelos ensinamentos prestados sempre com gentileza. Obrigada à Tatiane Rodrigues e à Silvia Costa, do Instituto de Biociências, pela colaboração e pela parceria de trabalho, sem as quais não poderíamos concretizar este projeto.

Sou também muito grata a todos os funcionários e médicos assistentes do LIM 25 e do LIM 42, laboratórios em que realizamos este trabalho, especialmente Dr. Vinícius, Eliete, Elisângela, Graça, Maria Aparecida, Miriam e Nilda.

Para Aline Otto e Adriana Braz, amigas queridas: muito obrigada. Sua ajuda, seu apoio e seu carinho, dentro e fora do hospital, foram fundamentais nestes anos. Agradeço às colegas Andréa Leal e Marcela França por serem “veteranas” generosas, e acima de tudo, amigas. Muito obrigada à Gabriela Vasques, Renata Scalco e Fernanda Corrêa pela convivência, pela parceria e pela amizade que construímos: aprender junto com vocês foi um presente para mim.

Finalmente, sou muito grata à minha família. Para minha querida mãe, Angela: muito obrigada pelo amor, pela dedicação, pelo apoio e pela confiança em meu trabalho. Para mim, você é um exemplo de generosidade e de ética na Medicina. Para minha irmã, Renata, e minha afilhada, Helena: muito obrigada pela alegria, pelo carinho e pelo companheirismo. Para meu pai, Olides, e sua família: muito obrigada pelos ensinamentos de vida. Para minha avó Norma, minha tia Denise e meu tio Caco: muito obrigada pelo carinho, pelo apoio e pela confiança em meu trabalho. E para meu avô, Luiz Carlos: agradeço pelo seu exemplo de mais de 60 anos de vida acadêmica, por sua confiança em meu trabalho e por sua paciência ao me aconselhar em momentos importantes de minha vida profissional. Ter todos vocês ao meu lado é uma fortaleza.

Gostaria de agradecer a todos os pacientes e familiares de pacientes que participaram deste projeto por sua gentileza e sua colaboração.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Pequeno para idade gestacional	4
1.2 <i>Array-CGH</i> e variações no número de cópias cromossômicas	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo principal	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 MÉTODOS	12
3.1 Considerações éticas	13
3.2 Casuística	13
3.3 Estudo molecular	17
3.3.1 Extração de DNA genômico de leucócitos periféricos	18
3.3.2 Hibridização genômica comparativa por <i>microarray</i> (<i>aCGH</i>)	19
3.4 Análise <i>in silico</i>	21
3.4.1 Análise do <i>array-CGH</i>	21
3.4.2 Análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado clínico incerto	24
4 RESULTADOS	27
4.1 Características da casuística	28
4.2 Resultados de <i>array-CGH</i> no grupo estudado	30
4.3 Pacientes com <i>CNVs</i> patogênicas e provavelmente patogênicas: descrição clínica, <i>array-CGH</i> e análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações	41
5 DISCUSSÃO	64
5.1 Deleção 22q11.21 presente na paciente 1	69
5.2 Duplicação 10q26.2-26.3 e deleção 10q26.3 presentes na paciente 2	71
5.3 Deleção 4q28.2-q31.21 presente no paciente 3	72
5.4 Deleção 3q27.1-q27.3 presente na paciente 4	73
5.5 Deleção 20p13 presente na paciente 5	75
5.6 Duplicação 14q11.2-q12 presente na paciente 6	76
5.7 Duplicação 16q24.1-q24 presente na paciente 7	77
5.8 Duplicação Xq13.1-q13.2 presente no paciente 8	78
6 CONCLUSÕES	80
7 REFERÊNCIAS	82
8 APÊNDICE	

LISTAS

ABREVIATURAS

aCGH	Hibridização genômica comparativa por microarray
CNV	Variação no número de cópias
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DECIPHER	Database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources
DGV	Database of genomic variants
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
GH	Hormônio do crescimento
GIANT	Consórcio <i>Genetic Investigation of Anthropocentric Traits</i>
GRCh37/hg19	<i>Genome Reference Consortium 37 / human genome 19</i>
GWAS	Estudos de associação global do genoma
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento insulina-símile tipo 2
IGFBP3	Proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile
MGI	<i>Mouse genome Informatics</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro

NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NH ₄ HCO ₃	Carbonato de amônia
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
PIG	Pequeno para idade gestacional
RCIU	Retardo de crescimento intrauterino
rhGH	Hormônio do crescimento recombinante humano
RNA	Ácido ribonucléico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
UCSC	<i>University of California Santa Cruz genome browser</i>
UNICEF	<i>United nation children's fund</i>
URL	<i>Uniform resource locator</i>
VC	Velocidade de crescimento

ABREVIATURAS DE GENES

<i>CHD8</i>	Gene da proteína 8 de ligação ao cromodomínio helicase-DHA
<i>CRKL</i>	Gene <i>V-crk avian sarcoma vírus CT10 oncogene homolog-like</i>
<i>CSNK2A1</i>	Gene da caseína-quinase II, alfa-1
<i>CTU2</i>	Gene da subunidade 2 da tiouridilase citosólica
<i>GAB1</i>	Gene da proteína de ligação 1 associada ao GRB2
<i>GALNS</i>	Gene da galactosamina 6-sulfatase
<i>GLRX3</i>	Gene da glutaredoxina 3
<i>HIRA</i>	Gene da histona A reguladora do ciclo celular
<i>IGF2BP2</i>	Gene da proteína de ligação ao RNA mensageiro do fator de crescimento insulina-símile tipo 2
<i>RANBP1</i>	Gene da proteína de ligação ran 1
<i>SPATA33</i>	Gene da proteína associada à espermatogênese 33
<i>SMAD4</i>	Gene <i>mothers against DPP homolog 4</i>
<i>TBX1</i>	Gene T-box 1
<i>TXNRD2</i>	Gene da tioredoxina redutase 2

SÍMBOLOS

cm/ano	Centímetros por ano
Δ	Delta
=	Igual
kg	Quilograma
kb	Quilobase
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor
$\leq$	Menor ou igual
mg/mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
Mb	Megabase
ng	Nanograma
ng/ μ L	Nanograma por microlitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
U/kg/dia	Unidades por quilogramas por dia

FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma para seleção de pacientes PIG no estudo	17
Figura 2 -	Resumo da estratégia do estudo da seleção de pacientes à classificação das CNVs	26
Figura 3 -	Resumo dos resultados de <i>array-CGH</i> no grupo estudado	33
Figura 4 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 1	43
Figura 5 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 2	46
Figura 6 -	Imagem do <i>aCGH</i> do paciente 3	49
Figura 7 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 4	51
Figura 8 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 5	54
Figura 9 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 6	57
Figura 10 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 7	60
Figura 11 -	Imagem do <i>aCGH</i> da paciente 8	63

TABELAS

Tabela 1 -	Principais causas genéticas descritas de retardo de crescimento pré-natal com persistência pós-natal	6
Tabela 2 -	Sinais e sintomas coletados em história e exame físico na abordagem diagnóstica inicial de baixa estatura realizada no Ambulatório de Desenvolvimento do HCFMUSP	15
Tabela 3 -	Avaliação laboratorial e radiológica complementar e avaliação de comorbidades na abordagem diagnóstica de baixa estatura realizada no Ambulatório de Desenvolvimento do HCFMUSP	16
Tabela 4 -	Ferramentas para caracterização funcional das CNVs patogênicas e de significado clínico incerto	25
Tabela 5 -	Características clínicas dos 51 pacientes selecionados	30
Tabela 6 -	Descrição, critérios para classificação da patogenicidade e critérios para caracterização do conteúdo gênico das CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas	34
Tabela 7 -	Genes codificantes afetados contidos nas CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas	35
Tabela 8 -	Descrição, critérios para classificação, padrão de herança e segregação familiar das CNVs categorizadas com de significado clínico incerto ou provavelmente benignas	37
Tabela 9 -	Características clínicas e dados auxológicos dos 8 pacientes nascidos PIG com CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas	38
Tabela 10 -	Desenvolvimento puberal, características laboratoriais e resposta no primeiro ano de tratamento dos 8 pacientes nascidos PIG com CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas	39
Tabela 11 -	Dados de acompanhamento dos pacientes PIG selecionados tratados com rhGH	40

RESUMO

Canton APM. *Variações no número de cópias cromossômicas submicroscópicas como causa de baixa estatura de início pré-natal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A pesquisa de variações no número de cópias (CNVs; *copy number variants*) cromossômicas tem revelado o importante papel destas alterações genômicas na diversidade populacional e na etiologia de doenças humanas. O modelo de associação de CNVs a doenças envolve deleções e/ou duplicações individualmente raras, mas com segmentos cromossômicos de tamanhos relevantes. Os pacientes com baixa estatura de início pré-natal constituem um grupo heterogêneo com quadros clínicos complexos frequentemente resultantes de alterações genéticas, que, desde o período intrauterino, perturbam os mecanismos e vias de desenvolvimento e crescimento fetais. Assim sendo, aventamos a hipótese de que CNVs raras possam estar entre as causas genéticas de baixa estatura de início pré-natal. Para tanto, nosso estudo visou avaliar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas em um grupo selecionado de pacientes nascidos pequenos para idade gestacional (PIG) com baixa estatura persistente sem causa definida. Foram avaliados 51 pacientes nascidos PIG com baixa estatura persistente após o 4º ano de vida que apresentavam dismorfismos, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) ou deficiência intelectual, porém sem caracterizar síndromes conhecidas e com cariótipo normal. Amostras de DNA dos pacientes foram submetidas à hibridização genômica comparativa por *microarray* (aCGH; *array comparative genomic hybridization*) baseada em oligonucleotídeos na plataforma 60K. Os achados foram comparados com CNVs descritas em bancos de dados de controles normais. Foram identificadas 18 CNVs, ausentes em controles saudáveis, em 17 dos 51 pacientes (33%). As alterações foram avaliadas para classificação de sua patogenicidade de acordo com os seguintes critérios: 1) padrão de herança e segregação familiar; 2) sobreposição a coordenadas genômicas de síndromes conhecidas; 3) sobreposição a CNVs patogênicas descritas em banco de dados; 4) e conteúdo gênico. Quatro CNVs, encontradas em 3 pacientes, foram classificadas como patogênicas: 1) del 22q11.21; 2) dup 10q26.2-26.3 e del 10q26.3; e 3) del 4q28.2-q31.21. Cinco CNVs, encontradas em 5 pacientes, foram classificadas como provavelmente patogênicas: 4) del 3q27.1-q27.3; 5) del 20p13; 6) dup 14q11.2-q12; 7) dup 16q24.1-q24; e 8) dup Xq31.1-q13.2. Somando os grupos, encontramos CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas em 16% do total de pacientes. De acordo com a segregação familiar, 4 variações foram consideradas de significado clínico incerto, enquanto 5 foram benignas. Para estabelecer uma relação causal genótipo-fenótipo e identificar genes associados a baixa estatura de início

pré-natal, foi realizada uma análise ampla do conteúdo gênico das variações classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas ou de significado clínico incerto, através do uso de efetivas ferramentas de bioinformática. Nossos resultados nos levam às seguintes conclusões: 1) a frequência de CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas no estudo foi de 16%, evidenciando que CNVs raras provavelmente estão entre as causas genéticas de baixa estatura de início pré-natal; 2) o *aCGH* permitiu a elucidação do diagnóstico e das bases genéticas envolvidas no fenótipo em 8 pacientes selecionados; e 3) foram encontradas CNVs em diferentes regiões cromossômicas, com diferentes genes candidatos, que podem estar envolvidos nos mecanismos de regulação do crescimento e/ou nas vias regulatórias de desenvolvimento intrauterino.

Descritores: Retardo de crescimento fetal/genética; Transtornos do crescimento/diagnóstico; Transtornos do crescimento/genética; Hibridização genômica comparativa; Deleção cromossômica; Duplicação cromossômica.

SUMMARY

Canton APM. *Submicroscopic chromosomal copy number variants as a cause of prenatal onset short stature* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Analysis of chromosomal copy number variants (CNVs) have demonstrated the important role of these genomic imbalances in population diversity and human disease. The model of CNV disease association involves deletions and/or duplications that are individually rare but encompass chromosomal segments of relevant size. Prenatal onset short stature patients constitute a complex group characterized by clinical heterogeneity. The causes of prenatal growth impairment frequently involve genetic changes that disturb the mechanisms and the pathways of fetal growth and development. Thus, we hypothesized that rare CNVs might contribute to the genetic etiology of prenatal onset short stature. In order to evaluate this assumption, our study analyzed the presence of submicroscopic deletions and/or duplications in a selected group of patients born small for gestational age with persistent short stature but without a recognized cause. A total of 51 patients with prenatal and postnatal growth retardation associated with dysmorphic features, developmental delay and/or intellectual disability, but without criteria for known syndromes, were selected. All patients had normal G-banded karyotyping. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a whole-genome 60K platform was performed using DNA obtained from all patients. Detected CNVs were compared with CNV data from healthy controls individuals, excluding common copy number polymorphisms. In 17 of the 51 patients screened (33%), 18 rare CNVs were identified. The pathogenicity of CNVs was assessed by considering the following criteria: inheritance and familial segregation; overlap with genomic coordinates for a known genomic imbalance syndrome; overlap with CNVs previously identified in other patients with prenatal onset short stature; and gene content. Four distinct CNVs, found in three patients, were classified as pathogenic: 1) del 22q11.21; 2) dup 10q26.2-26.3 and del 10q26.3; and 3) del 4q28.2-q31.21. Five CNVs, found in five patients, were classified as probably pathogenic: 4) del 3q27.1-q27.3; 5) del 20p13; 6) dup 14q11.2-q12; 7) dup 16q24.1-q24; and 8) dup Xq31.1-q13.2. Taken both groups together, we found pathogenic or probably pathogenic CNVs in 16% of patients. According to familial segregation, four variants were considered as variants of uncertain clinical significance, while five variants were considered as benign. In an attempt to establish a causal genotype-phenotype correlation and to identify genes involved in growth impairment of prenatal onset, the gene content of the variants was analyzed using bioinformatics tools for gene prioritization. Based on our results, it is possible to make the following conclusions: 1) the frequency of pathogenic or probably pathogenic CNVs

was at least 16%, indicating that rare CNVs are probably among the genetic causes of prenatal onset short stature; 2) aCGH clarified the diagnosis and the genetic etiology involved in the phenotype of 8 selected patients; and 3) we found CNVs in distinct chromosomal regions with several candidate genes that may be involved in the mechanisms of growth regulation and/or in the regulatory pathways of intrauterine development.

Descriptors: Fetal growth retardation; Growth disorders/diagnosis; Growth disorders/genetics; Comparative genomic hybridization; Chromosome deletion; Chromosome duplication.

1 INTRODUÇÃO

A identificação de defeitos moleculares associados a doenças genéticas persiste um desafio para pesquisadores. A descrição do número de cromossomos ⁽¹⁾ e do padrão de bandeamento dos mesmos ⁽²⁾, nas décadas de 50 e 60 respectivamente, possibilitaram as primeiras associações entre alterações cromossômicas e algumas síndromes. Desde então, deleções, duplicações e outros rearranjos complexos começaram a ser descritos e associados a quadros clínicos sindrômicos.

Na década de 80, o desenvolvimento de técnicas de imunofluorescência para detecção de regiões do DNA utilizando sondas específicas resultou na hibridização *in situ* fluorescente (*FISH, fluorescent in situ hybridization*) ⁽³⁾. Esta técnica possibilitou a identificação de sequências em cromossomos metafásicos, bem como a localização em núcleos interfásicos de sequências específicas, revolucionando a citogenética, que deixou de se limitar à análise puramente visual de cromossomos metafásicos ⁽⁴⁾. Avanços no campo da microscopia óptica e no uso de coleções de sondas (“bibliotecas de DNA”) permitiram o desenvolvimento de sondas capazes de hibridar com todos os cromossomos por inteiro. Na década de 90, foi descrita a hibridização genômica comparativa (*CGH, comparative genomic hybridization*) ⁽⁵⁾. A hibridização competitiva de um DNA teste e um DNA referência, marcados com diferentes fluorocromos, em cromossomos metafásicos, possibilitou um rastreamento do genoma para detecção de perdas e ganhos de regiões cromossômicas.

Esta evolução no campo da citogenética foi acompanhada pelo avanço das técnicas de biologia molecular, particularmente com o surgimento do sequenciamento genômico ⁽⁶⁾ e da técnica de amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (*MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification*) ⁽⁷⁾. Utilizando a estratégia de genes candidatos, várias causas de doenças monogênicas foram elucidadas com a demonstração de mutações de ponto e/ou deleções nos genes estudado. Apesar do incontestável avanço tecnológico resultante das diversas estratégias para investigação molecular, muitos quadros clínicos, inclusive casos familiares, permanecem sem causa genética elucidada. Uma importante limitação destas metodologias encontra-se na necessidade de escolha de uma região específica previamente identificada, restringindo a abrangência destas análises no estudo do genoma humano.

Neste contexto, surgiram as metodologias baseadas em *arrays* genômicos. Os cromossomos metafásicos do *CGH* foram substituídos por sequências específicas de DNA (por exemplo, BAC clones ou oligonucleotídeos) dispostas em *arrays*. Assim, surgiu o *array-CGH (aCGH)*, uma metodologia de alta resolução capaz de varrer todo o genoma à procura de variações no número de cópias de segmentos de DNA ⁽⁸⁾. Rapidamente esta técnica tornou-se a metodologia de escolha para investigação molecular de condições que apresentam grande heterogeneidade genética, como pacientes com retardo mental, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), transtornos do espectro do autismo e múltiplas anomalias congênitas ⁽⁹⁾. Mais ainda, o *aCGH*

estabeleceu-se como de importante aplicabilidade clínica na identificação de novas síndromes, na delineação de síndromes conhecidas, na descoberta de genes causadores de doenças, na detecção de genes envolvidos na patogênese do câncer e no diagnóstico pré-natal ⁽¹⁰⁾.

1.1 PEQUENO PARA IDADE GESTACIONAL

A criança nascida pequena para idade gestacional (PIG) é definida como aquela com peso e/ou comprimento ao nascimento 2 ou mais desvios-padrão (DP) abaixo da média populacional para idade gestacional ^(11, 12). Esta condição decorre, na maioria das vezes, de um processo fisiopatológico de diminuição na velocidade de crescimento fetal *in utero*, denominado retardo de crescimento intrauterino (RCIU). De acordo com dados da UNICEF de 2003, a prevalência estimada de crianças com baixo peso e/ou comprimento ao nascer é de aproximadamente 14% na população mundial e 9% nos países da América Latina ⁽¹³⁾. Entretanto, estudo multicêntrico recente mostrou uma prevalência mundial de crianças nascidas a termo com baixo peso ao nascer entre 0,6% e 8,9%, com média de 3,2% e taxa correspondente à coorte brasileira de 1,9%. Quando foram avaliados em conjunto os nascidos a termo e os nascidos pré-termo, a prevalência mundial de baixo peso ao nascer foi entre 2,1% e 13,6%, com média de 5,6% e taxa correspondente à coorte brasileira de 5,8%. Este estudo avaliou dados antropométricos dos fetos durante a gestação e dos neonatos ao

nascimento de 20.486 crianças nascidas de gestações consideradas sem quaisquer intercorrências e em condições socioambientais adequadas em coortes em 8 cidades de diferentes países, inclusive do Brasil ⁽¹⁴⁾.

A maioria das crianças nascidas PIG apresenta recuperação espontânea do crescimento (o chamado “*catch-up growth*”) na primeira infância, ao redor do segundo e até o quarto ano de vida, atingindo uma altura dentro da normalidade ⁽¹⁵⁾. Entretanto, aproximadamente 10-15% delas não recuperam o crescimento e permanecem com escore-Z da altura ≤ -2 durante a infância e a vida adulta ⁽¹⁶⁾. Entre este grupo de crianças nascidas PIG sem *catch-up growth*, o risco relativo de baixa estatura aos 18 anos é de 7,1 para aqueles com baixo comprimento ao nascer e de 5,2 para aqueles com baixo peso ao nascer ⁽¹⁶⁾.

As causas subjacentes à ocorrência de RCIU, com nascimento de uma criança com baixo peso e/ou comprimento, são diversas, incluindo fatores maternos, placentários e fetais ⁽¹²⁾. Dentre os últimos, destacam-se as alterações genéticas (Tabela 1), que costumam evoluir com quadros clínicos complexos, envolvendo não apenas retardo de crescimento persistente na vida pós-natal, como dismorfismos, anomalias congênitas e distúrbios de DNPM.

Tabela 1 - Principais causas genéticas descritas de retardo de crescimento pré-natal com persistência pós-natal^(17, 18)

	Exemplos	Genes ou regiões de genes envolvidos
Anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais	Trissomia autossômica	Diversos
	Monossomia do X	Diversos
	Cromossomo em anel	Diversos
Síndromes de genes contíguos	Deleção 22q11.2	Diversos
	Deleção 15q	<i>IGF1R</i>
Defeitos no sistema IGFs	Deficiência isolada de IGF-1	<i>IGF1</i>
	IGF-1 biologicamente inativo	
	Insensibilidade ao IGF-1	<i>IGF1R</i>
Via da síndrome 3-M	Síndrome 3-M	<i>CUL7</i>
		<i>OBSL1</i>
		<i>CCDC8</i>
Doenças do <i>imprinting</i> genômico	Síndrome de Silver-Russell	Hipometilação do ICR1 em 11p15.5
		Dissomia uniparental materna do cromossomo 7
Displasias esqueléticas	Acondroplasia	<i>FGFR3</i>
	Displasia espondiloepifisária congênita	<i>COL2A1</i>
Defeitos na replicação do DNA	Seckel	<i>ATR</i>
		<i>ATRIP</i>
	Meier-Gorlin	<i>CPAP</i>
		<i>CEP152</i>
		<i>ORC1</i>
		<i>ORC4</i>
	MOPD tipo 1 (<i>Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism I</i>)	<i>ORC6</i>
		<i>CDT1</i>
	MOPD tipo 2 (<i>Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism II</i>)	<i>CDC6</i>
Síndromes de instabilidade cromossômica	MOPD tipo 1 (<i>Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism I</i>)	<i>RNU4ATAC</i>
	MOPD tipo 2 (<i>Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism II</i>)	<i>PCNT</i>
	Bloom	<i>BLM</i>
	Fanconi	Diversos

Deste modo sabemos que desequilíbrios cromossômicos e desordens genéticas podem causar quadros clínicos complexos, incluindo déficit de crescimento fetal com nascimento de criança PIG e evolução para baixa estatura persistente na vida pós-natal. Sabemos ainda que estes casos de alterações genéticas incluem características diversas como dismorfismos, anomalias congênitas e distúrbios de DNPM. Esta variabilidade clínica parece decorrer do envolvimento simultâneo de diversos genes, assim como da pluralidade das ações ou expressões de certos genes envolvidos nos distúrbios de crescimento pré-natal. Alguns destes fatores etiológicos genéticos estão bem estabelecidos ⁽¹⁹⁾, enquanto outros permanecem sem elucidação pela investigação convencional de baixa estatura. A utilização de metodologias de genética molecular com capacidade de investigação abrangente do genoma humano forneceria vantagens no estudo desta condição.

1.2 *Array-CGH* E VARIAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS CROMOSSÔMICAS

Os *kits* comercialmente disponíveis para *aCGH*, em especial para aqueles *arrays* baseados em oligonucleotídeos, permitem analisar simultaneamente milhares de regiões cromossômicas, identificando ganhos e perdas genômicas submicroscópicas e fornecendo informações relativamente detalhadas a respeito do ponto de quebra e da extensão das

regiões possivelmente deletadas ou duplicadas ⁽²⁰⁾. A análise de número de cópias genômicas baseada em *microarray* é também chamada citogenética molecular ou cariotipagem molecular. A resolução e a precisão destes ensaios são determinadas pela quantidade de sondas, pelo tamanho das sondas e pela distância entre estas. A sensibilidade e a especificidade da cariotipagem molecular são no mínimo dez vezes maiores do que as dos métodos de citogenética convencional, que permitem apenas a detecção de aberrações cromossômicas grandes e raras ^(9, 10).

Os desequilíbrios genômicos caracterizados pelo *aCGH* são chamados variações no número de cópias (*CNVs*, *copy number variants*). Estas são variações que alteram o *status* diplóide de um locus particular do genoma humano, essencialmente deleções e duplicações ⁽²¹⁾. Operacionalmente, são definidas como um segmento de DNA com número de cópias variável maior do que 1 kb, sendo consideradas variações estruturais do genoma de tamanho intermediário ^(21, 22). Com o uso progressivo da citogenética molecular, as *CNVs* tem surgido como fonte significativa de variabilidade genética, sendo implicadas em aspectos da diversidade populacional, bem como em etiologia de doenças individuais ⁽²²⁾.

Recentemente, muitos estudos tem descrito a associação de *CNVs* com quadros clínicos específicos. No campo da Endocrinologia, a cariotipagem molecular tem sido usada como ferramenta na identificação de causas genéticas para diversas condições, incluindo falência ovariana prematura ⁽²³⁾, obesidade severa de início precoce ⁽²⁴⁾, hipotireoidismo congênito e disgenesia tireoideana ⁽²⁵⁾, genitália ambígua ⁽²⁶⁾, defeitos

esqueléticos com déficit de crescimento ⁽²⁷⁾ e síndrome de Silver-Russell ⁽²⁸⁾. Mais ainda, esta técnica foi também incluída por alguns autores no algoritmo diagnóstico de avaliação genética de baixa estatura, sendo indicada para pacientes com quadros de baixa estatura associada a outras características dismórficas sem uma síndrome genética reconhecida ⁽¹⁹⁾.

Assim sendo, propusemos no presente estudo avaliar a presença de variações no número de cópias submicroscópicas (perdas ou ganhos de material genômico) em um grupo selecionado de pacientes nascidos PIG com baixa estatura persistente associada a dismorfismos, atraso de DNPM ou deficiência intelectual, sem causas definidas. Selecionamos pacientes com estas características clínicas, uma vez que costumam ser frequentes em quadros de RCIU por alterações genéticas fetais. Além disto, este grupo de pacientes tem maior probabilidade de apresentar alterações genômicas que incluam vários genes. Para tanto, utilizamos como metodologia o *aCGH*, ensaio com alta resolução para detecção de desequilíbrios genômicos que possam conter genes ou regiões de genes responsáveis pelo retardo de crescimento pré e pós-natal deste grupo selecionado de pacientes, na expectativa de contribuir de forma significativa entendimento das causas genéticas de baixa estatura de início pré-natal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o mecanismo genético responsável pelo quadro de retardo de crescimento pré e pós-natal em um grupo selecionado de pacientes nascidos PIG com baixa estatura persistente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Estudar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas em um grupo selecionado de pacientes nascidos PIG com baixa estatura persistente.

2.2.2 Avaliar a frequência de variações no número de cópias patogênicas em um grupo de pacientes nascidos PIG com baixa estatura persistente associada a distúrbios, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou deficiência intelectual.

2.2.3 Identificar possíveis genes candidatos responsáveis pelo retardo de crescimento pré e pós-natal para serem avaliados em estudos sequenciais.

3 MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki (adotada na 18^a. Assembléia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia, 1964). O projeto de pesquisa foi submetido à aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HCFMUSP) (protocolo de pesquisa número 0036/11). Após a aprovação do estudo, consentimento livre por escrito foi obtido junto aos pacientes e/ou responsáveis legais para inclusão no projeto.

3.2 CASUÍSTICA

Dentre um grupo de 137 pacientes PIG acompanhados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), foram selecionados para o estudo 51 pacientes submetidos à investigação clínica e laboratorial, conforme protocolo padrão de investigação de baixa estatura (Tabelas 2 e 3), de acordo com os seguintes critérios (Figura 1):

Inclusão:

1. Escore-Z de peso e/ou comprimento ao nascer ≤ -2 ⁽²⁹⁾;
2. Ausência de recuperação espontânea do crescimento após o nascimento, comprovada por escore-Z de altura $< -2,0$ em idade maior ou igual a 4 anos ⁽³⁰⁾;
3. Presença de características dismórficas (tais como microcefalia, cardiopatias congênitas, alterações esqueléticas, entre outras), atraso de DNPM e/ou deficiência intelectual ⁽³¹⁾ associados no quadro clínico e com avaliação por médico geneticista não conclusiva ⁽¹⁹⁾;
4. Cariótipo com bandeamento G normal;

Exclusão:

1. Identificação de causas materno-placentárias de RCIU, tais como hipertensão arterial, diabetes, descolamento prematuro de placenta, insuficiência uteroplacentária, placentação anômala, gemelaridade, tabagismo, uso de drogas lícitas ou ilícitas ou infecções congênitas (toxoplasmose, rubéola, sífilis, citomegalovirose, herpes vírus e vírus da imunodeficiência humana);
2. Presença de causas conhecidas e/ou diagnosticadas de baixa estatura após o nascimento, tais como doenças endocrinológicas, displasias esqueléticas, doenças hepáticas, doenças sistêmicas, desnutrição e doenças genéticas estabelecidas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Sinais e sintomas coletados em história e exame físico na abordagem diagnóstica inicial de baixa estatura realizada no Ambulatório de Desenvolvimento do HCFMUSP¹

História clínica
Idade gestacional e peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento para classificação de pequeno para idade gestacional ou adequado para idade gestacional
História de intercorrências gestacionais
Dados de crescimento prévios para análise do padrão e da velocidade de crescimento
Idade de início dos sinais de puberdade
Doenças e cirurgias prévias e uso de medicações
História médica dos sistemas
História da amamentação e da alimentação
Marcos do desenvolvimento neuropsicomotor
Presença de consangüinidade
Altura medida dos pais para cálculo da altura alvo e altura dos irmãos
Idade de início dos sinais de puberdade dos pais e irmãos
Presença de fenótipo semelhante ao dos pacientes nos pais ou irmãos
Exame físico
Comprimento ou altura, peso, índice de massa corporal, perímetro cefálico, altura sentada, envergadura
Características dismórficas
Desenvolvimento puberal ²
Exame físico geral

1 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

2 – Desenvolvimento puberal de acordo com os estágios de Tanner⁽³²⁾.

Tabela 3 - Avaliação laboratorial e radiológica complementar e avaliação de comorbidades na abordagem diagnóstica de baixa estatura realizada no Ambulatório de Desenvolvimento do HCFMUSP¹

Exames	Patologias excluídas
Hemograma completo e velocidade de hemossedimentação	Anemia, infecções, doenças inflamatórias crônicas
Albumina e ferritina	Estado nutricional
AST, ALT γ GT ²	Hepatopatias crônicas
Creatinina, sódio e potássio séricos; gasometria venosa; urina tipo 1	Nefropatias, acidose tubular renal
Cálcio e fósforo séricos; fosfatase alcalina	Distúrbios de cálcio e fósforo
Anticorpos anti-endomíseo IgA e IgG; dosagem de IGA total ³	Doença celíaca
Exame parasitológico de fezes	Verminoses
TSH, T4 livre, anticorpos tireoideanos (anti-TPO e anti-Tg) ⁴	Tireoideopatias
GH, IGF-1, IGFBP3 ^{5,6}	Distúrbios do eixo GH/IGF-1
Cariótipo com bandeamento G	Síndrome de Turner e outras anormalidades cariotípicas
Radiografia de mão e punho esquerdos	Idade óssea ⁷
Radiografia de esqueleto completo (crânio, coluna, bacia, membros superiores, membros inferiores; em 2 incidências) ⁸	Displasias esqueléticas
Ecocardiograma bidimensional com doppler colorido ⁸	Cardiopatias congênicas
Ultrassonografia abdominal total ⁹	Anomalias de vias urinárias ou outras malformações intra-abdominais
Audiometria ^{8,9}	Surdez
Avaliação oftalmológica ^{8,9}	Oftalmopatias congênicas

1 - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

2 - ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; γ GT: gama-glutamilttransferase

3 - IgA: imunoglobulina A; IgG: imunoglobulina G

4 - TSH: Hormônio estimulador da tireóide; Anti-TPO: anti-tireoperoxidase; Anti-Tg: antitireoglobulina

5 - GH: Hormônio do crescimento; IGF-1: Fator de crescimento insulina-símile tipo 1; IGFBP3: proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile

6 - Valores de concentração de GH são avaliados em teste de estímulo farmacológico para secreção de GH, realizado se houver indicação por suspeita clínica e/ou laboratorial

7 - Idade óssea de acordo com os padrões de Greulich & Pyle⁽³³⁾

8 - Solicitados apenas nos quadros clinicamente suspeitos

9 - Exames para avaliação de comorbidades comumente presentes em quadros de variações de número de cópias cromossômicas

Figura 1 - Fluxograma para seleção de pacientes PIG no estudo

3.3 ESTUDO MOLECULAR

Amostras de DNA genômico dos 51 pacientes incluídos no estudo e de 28 familiares destes (14 amostras maternas, 11 amostras paternas e três amostras de outros parentes em primeiro grau) foram submetidas ao estudo molecular, conforme as etapas e os procedimentos descritos a seguir.

3.3.1 Extração de DNA genômico de leucócitos periféricos

Os procedimentos de extração de DNA genômico de leucócitos periféricos foram realizados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM/42) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes e familiares selecionados. Quinze mililitros (ml) de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao método de extração com NaCl saturado ⁽³⁴⁾. Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias (NH_4Cl 114 mM; NH_4HCO_3 1 mM) e uma etapa de lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0), utilizando SDS (0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado, seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) 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 superior a 1,75. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0), contendo o corante SYBR Safe® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 1x, e observadas em um transiluminador com luz

ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa, foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/ μ L) e 20 ng do λ DNA (10 ng/ μ L).

3.3.2 Hibridização genômica comparativa por *microarray* (aCGH)

Os experimentos de hibridização genômica comparativa por *microarray* foram realizados no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Para todos os pacientes em estudo, foi utilizada a plataforma 60K de oligonucleotídeos SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit[®] 8 X 60K (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA), composta de lâminas com oito áreas de hibridização de aproximadamente 60.000 oligonucleotídeos cada. Cada uma das áreas de uma lâmina é usada para hibridização de material genético de um paciente, podendo-se realizar o estudo de oito pacientes com uma única lâmina, o que torna os custos desta plataforma mais acessíveis. Esta plataforma de *microarray* proporciona uma cobertura ao longo de todo o genoma humano (“*whole-genome*”) e apresenta uma resolução de 50kb (espaçamento médio entre as sondas de oligonucleotídeos de 50 kb). Todas as etapas descritas a seguir foram realizadas conforme o protocolo do fabricante ⁽³⁵⁾.

Para o experimento de cada paciente, foram preparadas e utilizadas duas amostras de DNA: DNA teste (DNA do paciente a ser testado) e DNA controle (DNA de referência). Ao final, as amostras continham quantidades equimolares, com concentração de 40 ng/ μ L e volume de 25 μ L. As amostras

de DNA foram colocadas em tubos distintos e quimicamente marcadas com diferentes fluorocromos. O DNA teste foi marcado com cianina 3 (Cy3) e o DNA controle, com cianina 5 (Cy5). Após a marcação, DNA do paciente e DNA controle foram co-hibridizados em uma das oito áreas de uma lâmina 60K de *microarray* genômico. A hibridização das lâminas usadas no estudo foi realizada em forno Agilent à temperatura de 65°C e por período de tempo de 16 horas.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas e escaneadas pelo equipamento High-Resolution Scanner® (SureScan High Resolution Technology, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As imagens do escaneamento foram extraídas e analisadas com o auxílio dos programas Software Feature Extraction® versão 10.7.3.1 e CGH Analytics 3.4.40 (ambos da Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O programa Genomic Workbench 6.9 Software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi aplicado para a chamada de CNVs, usando o algoritmo de análise estatística Aberration Detection Method 2, com um limiar de sensibilidade de 6,0.

A razão $\log_2$ das intensidades de sinal de cianina 3:cianina 5 (teste:controle) foi usada pelo programa para chamar CNVs, ou seja, para considerar a alteração de um segmento genômico como uma deleção ou uma duplicação. Razões $\geq 0,3$ foram consideradas duplicações, enquanto razões $\leq -0,3$ foram consideradas deleções. Nos estudos de *microarrays* de oligonucleotídeos, uma única sonda alterada não determina número de cópias de forma confiável. Assim, foram consideradas como ganhos ou

perdas de material genômico apenas as alterações de sinal que abrangessem ao menos três sondas consecutivas com a mesma alteração. Além disto, um tamanho mínimo de 50kb também foi usado pelo programa como critério para chamar alterações como *CNVs* ⁽⁹⁾.

Para todas as hibridizações, foram usadas amostras de DNA controle de indivíduos do mesmo sexo do paciente em análise. Além disso, todos os pacientes foram avaliados duas vezes para confirmação através de um processo de marcação invertida denominado “*reverse labelling*”. Neste processo, primeiramente amostra de DNA de um determinado paciente foi marcada e testada como DNA teste. Num segundo momento, amostra de DNA deste mesmo indivíduo foi marcada e usada como DNA controle para outro paciente em estudo. As *CNVs* não detectadas em ambos experimentos foram desconsideradas.

Explicações adicionais sobre a metodologia do *aCGH* podem ser encontradas em: <http://youtu.be/MMkYSWzOwrY>

3.4 ANÁLISE *in silico*

3.4.1 Análise do *array-CGH*

As coordenadas genômicas dos segmentos cromossômicos considerados *CNVs* na análise do *aCGH* foram dispostas de acordo com o *Human Genome Building* GRCh37/hg19 (*Genome Reference Consortium human genome*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>).

A primeira etapa nesta análise foi a exclusão de variações de número de cópias consideradas polimorfismos. Para tanto, todos os segmentos considerados alterados foram comparados com dados de *CNVs* em indivíduos normais, compilados pelo *Database of Genomic Variants* (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation>). Variações de número de cópias relatadas em indivíduos controles em pelo menos três estudos distintos foram consideradas como não relacionadas ao fenótipo estudado. Foram incluídos para comparação apenas estudos baseados em *array-CGH* por oligonucleotídeos ou em *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *arrays*. Para complementar esta análise, as alterações detectadas foram comparadas com os dados de 400 indivíduos saudáveis brasileiros (controles normais) estudados na mesma plataforma no Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As *CNVs* consideradas polimorfismos (com frequência > 1% na população geral) foram desconsideradas para futura análise.

A segunda etapa consistiu na avaliação da patogenicidade das variações encontradas, seguindo quatro critérios baseados nas estratégias típicas usadas para interpretação do status de uma *CNV* como patogênica ou benigna ^(9, 22). O primeiro critério incluiu o padrão de herança e a segregação familiar com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal. As variações *de novo*, as variações herdadas de pais afetados e as variações similares às de parentes de primeiro grau afetados foram consideradas como provavelmente patogênicas. Enquanto isso, as variações herdadas de

pais saudáveis ou presentes em parentes de primeiro grau saudáveis foram consideradas como provavelmente benignas ^(9, 22).

O segundo critério usado foi a sobreposição das CNVs às coordenadas genômicas de síndromes de microdeleções e/ou microduplicações conhecidas e descritas na literatura. Esta busca foi realizada através do OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). O terceiro princípio usado foi a sobreposição das alterações a desequilíbrios genômicos de outros pacientes com baixa estatura de início pré-natal descritos em banco de dados de CNVs. Esta busca foi realizada através do DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*; <http://decipher.sanger.ac.uk/>), um banco de dados com desequilíbrios cromossômicos e seus fenótipos associados ⁽³⁶⁾. O quarto critério usado foi o conteúdo gênico das CNVs encontradas, realizando-se sua anotação e sua avaliação através do UCSC (*University of California, Santa Cruz Genome Browser*; <http://genome.ucsc.edu/>). O conteúdo gênico incluiu o número total de genes codificadores, bem como a presença de genes com função associada a processos de desenvolvimento e/ou a vias de crescimento celular ou ainda a presença de genes cujos modelos animais apresentassem prejuízo de crescimento.

De acordo com a estratégia descrita acima, as deleções e duplicações encontradas nos pacientes selecionados foram classificadas como patogênicas quando preencheram todos os quatro critérios. As CNVs foram classificadas como provavelmente patogênicas quando preencheram todos os critérios, exceto a sobreposição às coordenadas genômicas de

síndromes de microdeleções e/ou microduplicações conhecidas. As CNVs foram classificadas como provavelmente benignas, principalmente quando não segregaram com o fenótipo de baixa estatura de início pré-natal dentro das famílias dos pacientes estudados. E, finalmente, as CNVs foram classificadas como variantes de significado clínico incerto, quando foram incapazes de serem classificadas em uma das outras três categorias mencionadas acima.

3.4.2 Análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado clínico incerto

Com o objetivo de estabelecer uma relação causal genótipo-fenótipo e identificar genes associados a baixa estatura de início pré-natal, foi realizada uma análise ampla do conteúdo gênico das variações classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas ou de significado clínico incerto. Esta avaliação foi realizada através do uso de ferramentas de bioinformática acessíveis na rede e com efetividade demonstrada em diversos estudos recentes da literatura médica ⁽³⁷⁾. As ferramentas usadas e suas descrições completas estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Ferramentas da análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das CNVs patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado clínico incerto

Ferramenta	URL ¹	Tipo de análise
UCSC ²	http://genome.ucsc.edu/	Avaliação dos desequilíbrios pelas posições genômicas exatas com anotação dos genes contidos no intervalo
DECIPHER ³	http://decipher.sanger.ac.uk/	Busca de outros pacientes com relato de baixa estatura de início pré-natal com desequilíbrios com sobreposição aos dos pacientes estudados
DGV ⁴	http://projects.tcag.ca/variation	Avaliação da presença dos genes deletados/duplicados em CNVs relacionadas como comuns em estudos em indivíduos normais da população
GWAS ⁵	http://genome.ucsc.edu/	Avaliação de locus para altura humana em estudos de associação global do genoma
miRBase	http://www.mirbase.org/	Avaliação da função dos microRNAs presentes nos desequilíbrios
miRTarBase	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php	Avaliação da função dos microRNAs presentes nos desequilíbrios
MGI ⁶	http://www.informatics.jax.org/	Busca de modelos animais com fenótipo “crescimento afetado” e/ou “retardo de crescimento fetal” em camundongos nocaute para os genes em desequilíbrio
OMIM ⁷	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim	Avaliação da função dos genes em desequilíbrio e busca de genes relacionados ao crescimento ou a vias de sinalização ligados ao crescimento Avaliação de sobreposição a síndromes de microaberrações descritas
Gene Card	http://www.genecards.org/	Avaliação da função dos genes em desequilíbrio e busca de genes relacionados ao crescimento ou a vias de sinalização ligados ao crescimento
Pub Med	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	Avaliação de relatos na literatura de casos ou estudos de pacientes com desequilíbrios genômicos semelhantes aos dos pacientes estudados
Gene Distiller	http://www.genedistiller.org/	Priorização de genes relacionados com crescimento

1 - URL: Uniform Resource Locator

2 - UCSC: *University of California, Santa Cruz Genome Browser*

3 - DECIPHER: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*

4 - DGV: *Database of Genomic Variants*

5 - GWAS: *Genome Wide Association Studies*

6 - MGI: *Mouse Genome Informatics*

7 - OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Men*

Figura 2 - Resumo da estratégia do estudo da seleção de pacientes à classificação das CNVs

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA

As características clínicas dos pacientes selecionados estão demonstradas na Tabela 5. A coorte se caracterizou por uma predominância do sexo masculino. Entre os pacientes, 34% foram nascidos PIG apenas por comprimento, 33% foram nascidos PIG apenas por peso e 33% foram nascidos PIG por comprimento e peso. Na primeira avaliação, os pacientes apresentavam baixa estatura persistente, com média de escore-Z de altura de $-3,2 \pm 0,8$, numa idade média na primeira avaliação de $7,6 \pm 3,7$ anos. Estas medidas, características de uma baixa estatura importante, contrastavam com um escore-Z de altura alvo dentro da normalidade. A diferença entre o escore-Z da altura de cada paciente e o escore-Z da altura alvo do mesmo paciente teve média de $-2,2 \pm 1,2$, evidenciando que, mesmo com a correção para a altura alvo, os pacientes apresentavam, como grupo, baixa estatura importante.

Atraso de DNPM ocorreu em 25% dos pacientes, enquanto deficiência intelectual foi diagnosticada em 9,8%. Microcefalia estava presente em 37% das crianças selecionadas. Cardiopatias congênitas ocorreram em 14% do grupo, sendo dois quadros de comunicação interatrial, dois quadros de comunicação interventricular, dois quadros de estenose pulmonar e um quadro de tetralogia de Fallot. Os quadros com indicação de correção

cirúrgica haviam sido previamente tratados, não justificando a ausência de recuperação do crescimento na vida pós-natal.

Alterações esqueléticas foram vistas em 41% dos pacientes, sendo clinodactilia em nove, ausência ou encurtamento de falanges médias de 4° e/ou 5° dedos das mãos em quatro, escoliose em quatro, cifo escoliose em um, cifose em um, luxação congênita de quadril em dois, lordose lombar acentuada em um, história de osteonecrose de epífise de cabeça femoral bilateral e de núcleos vertebrais em um e agenesia de 12° arco costal esquerdo concomitante a fusão de corpos vertebrais em um.

Outros dismorfismos foram diagnosticados em 73% do grupo; os mais frequentes, bem como o número de pacientes em que ocorreram, foram os seguintes: palato ogival em nove, pectus excavatum em nove, face triangular em oito, criptorquidia em oito, assimetria facial e/ou corporal em sete, orelhas displásicas em sete, estrabismo em cinco, retrognatia em cinco, implantação baixa das orelhas em cinco, história de hérnia umbilical ao nascimento em cinco, hipertelorismo em quatro, epicanto em quatro e pescoço curto em quatro. Nenhum dos achados esqueléticos ou dismórficos caracterizaram síndromes genéticas estabelecidas.

4.2 RESULTADOS DE *array-CGH* NO GRUPO ESTUDADO

Foram identificadas 18 *CNVs* raras em 17 dos 51 pacientes selecionados (33%) (Figura 3). Nove variações encontradas foram microdeleções e nove foram microduplicações. O tamanho das perdas cromossômicas submicroscópicas variou de 0,17 a 15,1 Mb; enquanto o dos ganhos variou de 0,26 a 4,4 Mb. Nenhuma destas *CNVs* foi descrita no banco de dados de 400 controles saudáveis do Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Tampouco os segmentos foram considerados polimorfismos quando comparados com estudos do *DGV*.

Tabela 5 - Características clínicas dos 51 pacientes selecionados

Características	Pacientes selecionados
Masculino : Feminino	32:19
Nascimento pré-termo : a termo	14:37
PIG por Z peso ao nascimento $\leq -2,0$	30 (59%)
PIG por Z comprimento ao nascimento $\leq -2,0$	32 (63%)
Escore-Z de altura alvo	$-1,0 \pm 1,0$
Escore-Z de altura paterna $\leq -2,0$	9 (17%)
Escore-Z de altura materna $\leq -2,0$	6 (12%)
Idade na 1ª avaliação	$7,6 \pm 3,7$
Escore-Z de altura na 1ª avaliação	$-3,2 \pm 0,8$
Atraso de DNPM	18 (25%)
Deficiência intelectual	5 (9,8%)
Microcefalia ¹	19 (37%)
Cardiopatía congênita	7 (14%)
Alteração esquelética	21 (41%)
Características dismórficas ²	37 (73%)

Valores numéricos são mostrados como média $\pm$ DP; valores categóricos são mostrados como %.

1 - Escore-Z de perímetro cefálico $\leq -2,0$.

2 - Face triangular, hipertelorismo, epicanto, palato ogival, estrabismo, orelhas displásicas, implantação baixa de orelhas, retrognatia, pescoço curto, assimetria facial e/ou corporal, pectus excavatum, criptorquidia, hérnia umbilical

Estudo de *aCGH* para segregação familiar com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal foi realizada em 28 familiares de 1º grau. Esta análise mostrou que em 10 pacientes as variações ocorreram *de novo*; em dois foram por herança paterna; e em dois foram por herança materna. A obtenção de material para análise familiar não foi possível para três pacientes.

A avaliação da patogenicidade das microdeleções e microduplicações encontradas foi realizada com a interpretação conjunta dos critérios supracitados (Figura 2).

Quatro CNVs, encontradas em três pacientes (pacientes 1 a 3; Tabela 6), foram classificadas como patogênicas. Cinco CNVs, encontradas em cinco pacientes, foram classificadas como provavelmente patogênicas (pacientes 4 a 8; Tabela 6). Todas as variações patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas foram *de novo*, bem como todas ocorreram em regiões cromossômicas com número relevante de genes codificantes. A lista completa destes genes está na Tabela 7. Oito destas variações ocorreram em posições genômicas que se sobrepõem a desequilíbrios genômicos de outros pacientes com baixa estatura de início pré-natal descritos no DECIPHER. Mais ainda, as deleções do paciente 1 (deleção 22q11.21), do paciente 2 (deleção 10q26.3) e do paciente 3 (deleção 4q) representaram síndromes de microdeleções previamente descritas na literatura. Os pacientes nascidos PIG com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas tinham fenótipos heterogêneos, se apresentando principalmente com baixa estatura não-familiar (n=8/8),

microcefalia (n=5/8), atraso de DNPM (n=4/8) e assimetria facial e/ou corporal (n=3/8).

Seguindo esta análise, quatro *CNVs*, encontradas nos pacientes 9 a 12, foram classificadas como variantes de significado clínico incerto (Tabela 8). Nos pacientes 9, 10 e 11, o padrão de herança não foi determinado pela impossibilidade na obtenção de material para análise dos pais. No paciente 12, a microdeleção, encontrada num paciente do sexo masculino, foi herdada da mãe, fenotipicamente normal, não sendo possível afastar um padrão de herança ligado ao X recessivo.

Finalmente, cinco *CNVs*, encontradas nos pacientes 13 a 17, foram classificadas como benignas pela não segregação familiar com fenótipo de baixa estatura (Tabela 8). Nos pacientes 13, 14, 15 e 16, as variações eram ausentes em familiares de 1º grau com fenótipo semelhante ao dos pacientes em estudo. Enquanto isso, nos pacientes 15, 16 e 17, as *CNVs* foram herdadas de genitores com fenótipo normal.

Na comparação dos segmentos cromossômicos alterados, o tamanho médio das *CNVs* patogênicas e provavelmente patogênicas foi de 4,0 Mb, significativamente maior do que o tamanho médio de 0,66 Mb das *CNVs* benignas somadas às variações de significado clínico incerto ($p=0,034$). Também o número médio de genes contidos nas regiões duplicadas/deletadas foi significativamente maior no grupo de *CNVs* patogênicas e provavelmente patogênicas (38 genes) em comparação com o grupo de *CNVs* de significado clínico incerto e benignas (1,8 genes) ($p<0,001$).

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas estão resumidos nas Tabelas 9 e 10 e serão detalhados a seguir juntamente com os dados moleculares destes desequilíbrios genômicos.

Figura 3 - Resumo dos resultados de *array-CGH* no grupo estudado

Tabela 6 - Descrição, critérios para classificação da patogenicidade e critérios para caracterização do conteúdo gênico das CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas

Paciente	Perda /Ganho	Herança	Locus	Posições genômicas ¹	Tamanho (Mb)	Número de genes afetados	DECIPHER ²	Modelo animal ³	Síndrome MD ⁴
CNVs patogênicas									
1	Perda	<i>de novo</i>	22q11.21	chr22:18.894.620-21.440.656	2,5	49	11	6	22q11.2
2	Ganho	<i>de novo</i>	10q26.2-q26.3	chr10:129.100.719-130.723.355	1,6	6	1	2	-
	Perda	<i>de novo</i>	10q26.3	chr10:130.811.542-135.404.671	4,5	34	11	2	10q26
3	Perda	<i>de novo</i>	4q28.2-q31.21	chr:129.437.805-144.588.797	15,1	30	5	5	4q intersticial
CNVs provavelmente patogênicas									
4	Perda	<i>de novo</i>	3q27.1-27.3	chr3:183.902.785-187.476.327	3,5	46	4	9	-
5	Perda	<i>de novo</i>	20p13	chr20:82.892-481.772	0,4	13	1	1	-
6	Ganho	<i>de novo</i>	14q11.2-q12	chr14:21.819.565-24.578.066	2,7	57	1	4	-
7	Ganho	<i>de novo</i>	16q24.1-q24	chr16:85.678.593-90.148.400	4,4	59	1	7	-
8	Ganho	<i>de novo</i>	Xq13.1-q13.2	chrX:71.553.894-73.461.083	1,9	14	-	3	-

1 - Posições genômicas de acordo com o *Human Genome Building* GCRh37/hg19

2 - Número de pacientes com relato de baixa estatura de início pré-natal com desequilíbrios genômicos com sobreposição ao do paciente estudado descritos no DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*)

3 - Número de genes com modelo animal nocaute com fenótipo "crescimento afetado" e/ou "retardo de crescimento fetal" de acordo com o MGI (*Mouse Genome Informatics*)

4 - Síndromes de microdeleção descritas na literatura de acordo com o OMIM

Tabela 7 - Genes codificantes afetados contidos nas CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas

Paciente	Perda /Ganho	Lócus	Genes codificantes afetados	
			Genes com funções em ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento	Outros genes
CNVs patogênicas				
1	Perda	22q11.21	DGCR6, DGCR14, DGCR2, GSC2, CLTCL1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, ARVCF, DGCR8, RANBP1, DGCR6L, MED15, SNAP29, CRKL, LZTR1, P2RX6	PRODH, TSSK2, SLC25A1, C22orf39, C22orf29, COMT, TRMT2A, ZDHHC8, TANGO2, RTN4R, RIMBP3, TMEM191B, USP41, SCARF2, ZNF74, KLHL22, PI4KA, SERPIND1, THAP7, LZTR1, SLC7A4, MIR4761, MIR1286, MIR185, MIR1306, MIR649
	Ganho	10q26.2-q26.3	DOCK1, PTPRE, MKI67	NPS, FOXI2, CLRN3
2	Perda	10q26.3	EBF3, GLRX3, BNIP3, JAKMIP3, INPP5A, MTG1, ADAM8, ECHS1	MGMT, TCERG1L, PPP2R2D, DPYSL4, STK32C, LRRC27, PWWP2B, C10orf91, NKX6-2, TCC40, GPR123, KNDC1, UTF1, VENTX, TUBGCP2, ZNF511, CALY, FUOM, PAOX, SPRN, CYP2E1, SYCE1,
				MIR4297, MIR378C, MIR202, MIR3944
3	Perda	4q28.2-q31.21	PCDH10, PCDH18, GAB1, SMARCA5	PHF17, SCLT1, PABPC4L, C4orf33, SLC7A11, CCRN4L, ELF2, MGARP, NDUFC1, NAA15, RAB33B, SETD7, MGST2, MAML3, SCOC, CLGN, ELMOD2, UCP1, TBC1D9, ZNF330, IL15, INPP4B, USP38, FREM3, RNF150, MIR340
CNVs provavelmente patogênicas				
4	Perda	3q27.1-q27.3	ECE2, PSMD2, EIF4G1, POLR2H, EPHB3, MAP3K13, LIPH, IGF2BP2, ETV5, ADIPOQ, TRA2B, DGKG, AHSG, FETUB, RFC4, BCL6	ABCF3, VWA5B2, ALG3, CAMK2N2, FAM131A, CLCN2, THPO, CHRD, MAGEF1, VPS8, C3orf70, EHHADH, TMEM41A, SENP2, C3orf65, CRYGS, TBCCD1, DNAJB11, HRG, KNG1, EIF4A2, ST6GAL1, RPL39L, RTP1, MASP1, RTP4, SST, RTP2, MIR1224, MIR1248
5	Perda	20p13	SOX12, TRIB3, CSNK2A1	DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB132, C20orf96, ZCCHC3, NRSN2, RBCK1, TBC1D20

continua

Tabela 7 (conclusão) - Genes codificantes afetados contidos nas CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas

Paciente	Perda /Ganho	Lócus	Genes codificantes afetados	
			Genes com funções em ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento	Outros genes
6	Ganho	14q11.2-q12	<i>SUPT16H, CHD8, DAD1, PSMB5, MRPL52, ACIN1, MMP14, HAUS4, EFS, IL25, AP1G2, JPH4, CPNE6, PCK2</i>	<i>TOX4, RAB2B, METTL3, SALL2, OR10G3, OR10G2, OR4E2, TCRA, TCRD, ABHD4, OXA1L, REM2, CEBPE, HOMEZ, MYH6, MYH7, AV4S1, SLC7A7, SLC7A8, PRMT5, LRP10, RBM23, C14orf93, AJUBA, PSMB11, C14orf119, SLC7A8, CDH24, BCL2L2, PABPN1, PPP1R3E, SLC22A17, CMTM5, NGDN, NRL, ZFH2, THTPA, DHRS2, DHRS4L2, DHRS4, LRRC16B, MIR208A, MIR208B</i>
7	Ganho	16q24.1-q24	<i>FOXL1, CA5A, BANP, ANKRD11, CDK10, TCF25, FANCA</i>	<i>GSE1, GINS2, EMC8, COX4I1, IRF8, FOXF1, FOXC2, MTHFSD, FBX031, MAP1LC3B, ZCCHC14, JPH3, KLHDC4, SLC7A5, ZNF469, ZFPM1, ZC3H18, IL17C, CTU2, CYBA, MVD, SNAI3, PIEZO1, TRAPPC2L, CBFA2T3, ACSF3, CDH15, SLC22A31, ZNF778, SPG7, RPL13, CPNE7, DPEP1, VPS9D1, CHMP1A, SPATA2L, ZNF276, SPIRE2, GAS8, PRDM7, TUBB3, DEF8, CENPBD1, DBNDD1, GALNS, APRT, PABN1L, CDT1, MIR1910, MIR5189, MIR4722</i>
8	Ganho	Xq13.1-q13.2	<i>HDAC8, NAP1L2, XIST, TSIX, MIR421</i>	<i>PHKA1, DMRTC1, CDX4, CHIC1, PABPC1L2B, PABPC1L2A, JPX, MIR374B, MIR374C</i>

Tabela 8 - Descrição, critérios de classificação, padrão de herança e segregação familiar das CNVs categorizadas como de significado clínico incerto ou provavelmente benignas

Paciente	Perda /ganho	Lócus	Posições genômicas ¹	Tamanho (Mb)	Número de genes afetados	DECIPHER ²	Modelo animal ³	Herança	Segregação familiar com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal
Variantes de significado clínico incerto									
9	Ganho	5q21.3	chr5:105.392.735-107.818.776	2,5	2	-	1	ND ²	ND
10	Perda	7q31.1	chr7:111.092.153-111.587.640	0,5	2	2	1	ND	ND
11	Perda	4q31.23	chr4:149.199.714-149.868.065	0,67	1	-	1	ND	ND
12	Perda	Xq25	chrX:127.144.113-127.302.253	0,15	1	-	-	materna	Perda presente na mãe com fenótipo normal
CNVs provavelmente benignas									
13	Perda	19q13.43	Chr19:59.078.547-59.095.568	0,17	1	-	1	de novo	Perda ausente na mãe com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal
14	Ganho	2p22.3	Chr2:32.654.637-33.294.923	0,6	5	2	2	de novo	Ganho ausente na filha com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal
15	Ganho	Xq22.3	chrX:107.778.452-108.205.023	0,4	2	2	1	paterna	Ganho ausente na mãe com fenótipo com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal e presente no pai com fenótipo normal
16	Ganho	7p22.2-22.1	chr7:3.818.367-4.617.503	0,8	1	-	-	paterna	Ganho ausente no irmão com fenótipo com fenótipo de baixa estatura de início pré-natal e presente no pai com fenótipo normal
17	Ganho	10p11.21	Chr10:35.100.425-35.360.369	0,26	2	-	1	materna	Ganho presente na mãe com fenótipo normal

1 - Posições genômicas de acordo com o *Human Genome Building* GCRh37/hg19

2 - Número de pacientes com relato de baixa estatura de início pré-natal com desequilíbrios genômicos com sobreposição ao do paciente estudado descritos no DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*)

3 - Número de genes com modelo animal nocaute com fenótipo “crescimento afetado” e/ou “retardo de crescimento fetal” de acordo com o MGI (*Mouse Genome Informatics*)

Tabela 9 - Características clínicas e dados auxológicos dos oito pacientes nascidos PIG com CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas

Paciente	Gênero	Idade na 1ª avaliação ¹	Escore-Z de altura ²	Escore-Z de altura alvo	IG ³ (semanas)	Escore-Z de PN ⁴	Escore-Z de CN ⁵	Achados clínicos
1	F	5a9m	-2,7	-1,5	39	-2,5	-1,4	Espinha bífida sem comunicação, clinodactilia do 5º dedo, aos 11 anos início de convulsões sem diagnóstico neurológico estabelecido
2	F	10a	-3,7	-0,8	39	-2,3	-3,0	Microcefalia (Z_{PC}^6 -2,0), fenda palatina, face triangular, surdez, estrabismo, assimetria corporal, pectus carinatum, deficiência intelectual, alterações de comportamento
3	M	5a8m	-2,7	0,3	38	-2,3	-2,6	Microcefalia (Z_{PC}^6 -2,1), orelhas displásicas, atraso de DNPM
4	F	4a9m	-3,0	-0,1	38	-1,8	-2,9	Microcefalia (Z_{PC}^6 -2,4), assimetria facial, atraso de DNPM, hiperatividade, déficit de atenção
5	F	6a4m	-2,9	-1,6	40	-2,1	-3,3	Epicaneto, pescoço curto, lordose lombar acentuada, pseudohipertrofia muscular
6	F	1a6m	-2,6	-1,3	38	-2,0	-3,8	Microcefalia (Z_{PC}^6 -2,0), leve estrabismo
7	F	19a	-2,5	-0,1	39	-1,7	-3,5	Asplenia, disgenesia de corpo caloso, estenose pulmonar, comunicação interatrial, escoliose, atraso de DNPM, deficiência intelectual
8	M	12a3m	-3,3	-0,4	31	-2,1	-3,6	Microcefalia (Z_{PC}^6 -2,0), estrabismo, comunicação interventricular, agenesia renal, criptorquidia, fusão vertebral, assimetria corporal, atraso de DNPM, deficiência intelectual

1 - Idade dada em anos (a) e meses (m)

2 - Escore-Z de altura dado de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)

3 - IG: Idade gestacional

4 - PN: Peso do nascimento

5 - CN: Comprimento do nascimento

6 - PC: Perímetro cefálico

Tabela 10 - Desenvolvimento puberal, características laboratoriais e resposta no primeiro ano de tratamento dos oito pacientes nascidos PIG com CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas

Paciente	Desenvolvimento puberal ¹	IO no 1º ano de acompanhamento ^{2,4}	IC-IO ^{2,3,4}	Escore-Z de IGF-1 ⁵	Escore-Z de IGFBP3 ⁶	GH ⁷	Δ do escore-Z de altura no 1º ano de uso de rhGH ⁸	Δ do Escore-Z da VC no 1º ano de uso de rhGH ^{8,9}
1	M1P1	4a6m	2a4m	-1,0	0,2	23,2	0,6	4,6
2	M1P1	6a10m	3a2m	-0,2	0,4	3,1	0,4	-0,9
3	M1P1	4a6m	1a8m	-0,5	0,1	11,4	ND ¹⁰	ND ¹⁰
4	M1P1	2a6m	2a4m	-2,0	-0,1	11,3	0,4	2,1
5	M1P1	5a9m	11m	3,6	-0,4	10,2	0,9	6,7
6	M1P1	3 ^a	1a3m	-1,0	1,0	11,2	ND ¹⁰	ND ¹⁰
7	M5P4	15a	4a	-2,0	-1,5	ND ¹⁰	ND ¹⁰	ND ¹⁰
8	M1P1	11a	1a2m	-1,0	-0,1	2,3	-0,4	-6,0

1 - Desenvolvimento puberal de acordo com os estágios de Tanner⁽³²⁾

2 - IO: Idade óssea de acordo com os padrões de Greulich & Pyle⁽³³⁾

3 - IC: Idade cronológica; IC-IO: diferença entre a idade cronológica e a idade óssea

4 - Idades óssea e cronológica dadas em anos (a) e meses (m)

5 - IGF-1: *Insulin-like growth factor-1*

6 - IGFBP3: *Insulin-like growth factor binding protein 3*

7 - GH: Concentração sérica máximas de hormônio do crescimento (*growth hormone*) em ng/ml; para as pacientes 1, 3 e 4 são dados valores de pico de GH em teste de estímulo; para as pacientes 2, 5, 6 e 8 são dados valores de GH basal

8 - rhGH: Hormônio do crescimento recombinante humano (*recombinant human growth hormone*)

9 - VC: Velocidade de crescimento

10 - ND: Não disponível; para os pacientes 3, 6 e 8 não há valores de Δ do escore-Z de altura e do Δ do escore-Z da VC, pois não foi feito uso de rhGH

Entre os 51 pacientes incluídos no estudo, 27 foram tratados com hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH, *recombinant human growth hormone*) com dose média de 50 µg/kg por dia; cinco destes pacientes eram carreadores de CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas. Os pacientes nascidos PIG com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas tiveram resposta de crescimento no primeiro ano de tratamento com rhGH similar aos pacientes nascidos PIG sem CNVs patogênicas (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados de acompanhamento dos pacientes PIG selecionados tratados com rhGH

	Pacientes tratados com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas (n=5)	Pacientes tratados com CNVs não-patogênicas (n=22)
No início do tratamento com rhGH		
Idade (anos)	8.5 ± 2.8	8.9 ± 3.1
Idade óssea (anos)	6.4 ± 2.9	6.9 ± 3.2
Escore-Z de altura	-3.3 ± 0.3	-3.5 ± 0.9
Velocidade de crescimento (cm/ano)	4.7 ± 0.7	4.4 ± 1.7
Escore-Z de índice de massa corporal	-1.9 ± 2.1	-1.2 ± 1.4
Após o primeiro ano do tratamento com rhGH		
Dose de rhGH (µg/kg/dia)	57 ± 9	48 ± 9
Velocidade de crescimento (ano)	8.8 ± 2.5	7.6 ± 1.5
Δ do escore-Z de altura	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.3

Valores numéricos são mostrados como média ± DP.

rhGH: Hormônio do crescimento recombinante humano (*recombinant human growth hormone*)

4.3 PACIENTES COM CNVs PATOGÊNICAS E PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS: descrição clínica, *array-CGH* e análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações

Paciente 1

A paciente 1 foi a primeira filha, de uma prole de duas, de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal sem outras características clínicas marcantes (Tabela 9). Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. A paciente apresentava inicialmente atraso de idade óssea e concentrações séricas normais de fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor type 1*) e proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulina-símile (IGFBP3, *insulin-like growth factor-binding protein 3*). Foi prescrito hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH, *recombinant human Growth Hormone*) (0,2 U/kg/dia) com boa resposta no primeiro ano de tratamento (Tabela 10). A terapia foi mantida por mais cinco anos com a paciente atingindo altura de 150 cm (escore-Z -1,8), dentro do canal familiar. Entretanto, entre 11 e 12 anos de idade, passou a apresentar quadro de convulsões de difícil controle sem diagnóstico neurológico. Dosagens de cálcio, fósforo e hormônio da paratireóide, bem como ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido foram normais.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma deleção intersticial de 2,5 Mb no cromossomo 22, com as seguintes coordenadas: [*arr 22q11.21 (18894620-21440656)x1*] (Figura 4). A *CNV* foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à deleção de 49 genes codificantes, dos quais 24 apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Análise no OMIM mostrou que esta deleção se sobrepõe à região cromossômica da síndrome de deleção 22q11.2 (ou Síndrome de DiGeorge) (#188400), uma síndrome de deleção de genes contíguos. Estudos de associação global do genoma (GWAS, *genome wide association studies*) não mostraram *locus* para altura humana nessa região até o momento.

No DECIPHER foram encontradas descrições de 86 pacientes com deleções que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura foi descrita como achado clínico em 11 destes; entretanto, em 47 as características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na deleção da paciente 1, seis apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*CRKL*, *HIRA*, *TBX1*, *PRODH*, *TXNRD2*, *RANBP1*).

Figura 4 - Imagem do *array-CGH* da paciente 1: todo o cromossomo 22 à esquerda e a região deletada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas deletadas em relação ao controle estão representadas em vermelho

Paciente 2

A paciente 2 foi a única filha de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com outras importantes características clínicas (Tabela 9), incluindo microcefalia ao nascimento, história de fenda palatina e assimetria facial. Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. A paciente apresentava inicialmente atraso de idade óssea e concentrações séricas normais de IGF-1 e IGFBP3 (Tabela 10). Análise com FISH para deleção 22 q11.2 foi realizada com resultado normal, pela suspeita clínica em avaliação com geneticista. Foi prescrito rhGH com resposta ruim no primeiro ano de tratamento (Tabela 10), sendo suspenso posteriormente. A paciente se manteve com baixa estatura sem recuperação (escore-Z de altura -3,0), fora de seu canal familiar de crescimento.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma duplicação intersticial de 1,6 Mb no cromossomo 10 seguida de uma deleção terminal de 4,5 Mb no mesmo cromossomo. As coordenadas da duplicação foram [*arr 10q26.2-q26.3 (129100719-130723355)x3*], enquanto as coordenadas da deleção foram [*arr 10q26.3 (130811542-135404671)x1*] (Figura 5). Tanto a duplicação quanto a deleção foram ausentes nos pais e com ocorrência *de novo*. A duplicação afetou seis genes codificantes; enquanto a deleção afetou 34 genes codificantes. Entre estes, três genes duplicados e oito genes deletados apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7).

Análise no OMIM mostrou que a deleção se sobrepõe à região cromossômica da síndrome de deleção 10q26 (#609625), uma síndrome de deleção de genes contíguos. Estudos de GWA não mostraram locus para altura humana tanto na região duplicada quanto na região deletada até o momento.

No DECIPHER foram encontradas descrições de 38 pacientes com deleções que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura foi descrita como achado clínico em 11 destes; entretanto, em 17 as características fenotípicas não foram descritas. Na análise da duplicação, foram encontrados 15 pacientes com ganhos cromossômicos que se sobrepõem ao encontrado em nossa paciente. Baixa estatura foi descrita em apenas um deles; entretanto, em nove as características fenotípicas não foram descritas. Este único paciente com duplicação coincidente à da paciente 2 e com baixa estatura descrito no DECIPHER apresenta um rearranjo composto pela duplicação intersticial seguida por uma deleção terminal no cromossomo 10, sendo um dos 11 pacientes com descrição de deleção coincidente à da paciente 2 e baixa estatura.

Dentre os genes contidos na deleção da paciente 2, o gene *GLRX3* apresenta modelo animal de camundongo nocaute com crescimento afetado e o gene *ADAM8* apresenta modelo animal de camundongo nocaute com esqueleto afetado. Por outro lado, dentre os genes contidos na duplicação da paciente, o gene *DOCK1* apresenta modelo animal de camundongo nocaute com crescimento afetado e o gene *PTPRE* apresenta modelo animal de camundongo nocaute com esqueleto afetado.

Figura 5 - Imagem do *array-CGH* da paciente 2: todo o cromossomo 10 à esquerda e a região da duplicação e da deleção vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas duplicadas em relação ao controle estão representadas em azul. As sondas deletadas em relação ao controle estão representadas em vermelho

Paciente 3

O paciente 3 foi filho único de pais não consanguíneos, nascido após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com outras características clínicas (Tabela 9), principalmente microcefalia e atraso de DNPM. Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. O paciente apresentava idade óssea atrasada, concentrações séricas de IGF-1 e de IGFBP3 normais e concentração sérica de hormônio do crescimento (GH, *growth hormone*) de 11,4 ng/ml. No momento, o paciente persiste em observação clínica para a possibilidade de uso de rhGH. Apresenta escore-Z de altura de -2,3 aos 7 anos e 6 meses, velocidade de crescimento (VC) de 4,9 cm/ano e estadió puberal de Tanner 1.

Realizado aCGH, foi encontrada uma deleção intersticial de 15,1 Mb no cromossomo 3 com as seguintes coordenadas: [arr 4q28.2-q31.21 (129437805-144588797)x1] (Figura 6). A CNV foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à deleção de 30 genes codificantes, dos quais quatro apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Análise no PubMed e no UCSC mostrou que a deleção se sobrepõe à região cromossômica da síndrome de deleção intersticial 4q, uma síndrome de deleção de genes contíguos. Estudos de GWA não mostraram lócus para altura humana na região deletada até o momento.

No DECIPHER foram encontradas descrições de 20 pacientes com deleções que se sobrepõem à encontrada em nosso paciente. Baixa estatura foi descrita como achado clínico em cinco destes; entretanto, em outros cinco casos as características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na deleção do paciente 3, cinco apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*GAB1*, *UCP1*, *IL5*, *PCDH10*, *CCRN4L*).

Na análise do OMIM, 23 genes incluídos na deleção do paciente 3 fazem parte da região de STQTL (*Stature Quantitative Trait Locus*) número 12 (#612224), uma região mapeada como associada ao traço de estatura com base em medidas globais de expressão de genes (38). Estes genes são os seguintes: *CCRN4L*, *ELF2*, *MGARP*, *NDUFC1*, *NAA15*, *RAB33B*, *SETD7*, *MGST2*, *MAML3*, *LOC152586*, *ELDOD2*, *UCP1*, *TBC1D9*, *SCOC*, *CLGN*, *ZNF330*, *RNF150*, *IL15*, *INPP4B*, *USP38*, *FREM3*, *SMARCA5* e *GAB1*.

Figura 6 - Imagem do *array-CGH* do paciente 3: todo o cromossomo 4 à esquerda e a região deletada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas deletadas em relação ao controle estão representadas em vermelho

Paciente 4

A paciente 4 foi a única filha de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com outras importantes características clínicas (Tabela 9), incluindo microcefalia e assimetria facial. Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. A paciente apresentava inicialmente atraso de idade óssea, concentração sérica de IGF-1 baixa e concentração sérica de IGFBP3 normal, porém concentração sérica de GH de 11,3 ng/ml. Foi prescrito rhGH (0,15 U/kg/dia) com boa resposta no primeiro ano de tratamento (Tabela 10). No momento, a paciente persiste em uso rhGH, apresentando escore-Z de altura de -1,4 aos 8 anos e 6 meses, VC de 7,2 cm/ano e estadio puberal de Tanner 1.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma deleção intersticial de 3,5 Mb no cromossomo 3 com as seguintes coordenadas: [*arr 3q27.1-q27.3 (183902785-187476327)x1*] (Figura 7). A *CNV* foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à deleção de 46 genes codificantes, dos quais 16 apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Dentre os estudos de GWA, o consórcio GIANT (*Genetic Investigation of Anthropocentric Traits Consortium*) evidenciou um locus com influência na altura humana contido na região da deleção em heterozigose da paciente. O polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP, single nucleotide polymorphism*) identificado neste locus foi o rs720390 e o gene mais próximo e mais provavelmente

relacionado a este *SNP* foi o gene da proteína de ligação ao RNA mensageiro do fator de crescimento insulina-símile tipo 2 (*IGF2BP2*)⁽³⁹⁾.

Figura 7 - Imagem do *array-CGH* da paciente 4: todo o cromossomo 3 à esquerda e a região deletada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas deletadas em relação ao controle estão representadas em vermelho

No DECIPHER foram encontradas descrições de 13 pacientes com deleções que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura de início pré-natal foi descrita como característica fenotípica em quatro destes. Dentre os genes contidos na deleção da paciente 4, nove apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*CHRD*, *ADIPOQ*, *ETV5*, *BCL6*, *EHHADH*, *SST*, *AHSG*, *MASP1*, *TRA2B*).

Paciente 5

A paciente 5 foi a única filha de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com outras características dismórficas (Tabela 9). Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. A paciente apresentava inicialmente concentração sérica de IGF-1 alta e de IGFBP3 normal. Foi prescrito rhGH (0,15 U/kg/dia) com boa resposta ao primeiro ano de tratamento (Tabela 10). A terapia foi mantida por mais três anos e a paciente atingiu altura de 135,5 cm aos 11 anos (escore-Z de -1,0), dentro do canal familiar.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma deleção intersticial de 0,4 Mb no cromossomo 20 com as seguintes coordenadas: [*arr 20p13 (82.892-481.772)x1*] (Figura 8). A *CNV* foi ausente nos pais, com ocorrência *de novo*, e levou à deleção de 13 genes, codificantes, dos quais três apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Estudos de GWA não mostraram *lôcus* para altura humana nessa região até o momento.

Figura 8 - Imagem do *array-CGH* da paciente 5: todo o cromossomo 20 à esquerda e a região deletada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas deletadas em relação ao controle estão representadas em vermelho

No DECIPHER foram encontradas descrições de 11 pacientes com deleções que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura foi descrita como achado clínico em um destes; entretanto, em oito as características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na deleção da paciente 5, o gene *CSNK2A1* apresentou modelo animal de camundongo nocaute com crescimento afetado.

Paciente 6

A paciente 6 foi a única filha de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com microcefalia (Tabela 7). Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. Apresentava discreto atraso da idade óssea e concentrações séricas normais de IGF-1 e IGFBP3 (Tabela 10). Após 4 anos e 6 meses, a paciente passou a apresentar recuperação espontânea da VC e da altura, não tendo indicação precisa para tratamento com rhGH até o momento. Apresenta escore-Z de altura de -1,9 aos 6 anos e 6 meses, VC de 4,9 cm/ano e estadio puberal Tanner 1, persistindo em acompanhamento com avaliações clínicas semestrais.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma duplicação intersticial de 2,7 Mb no cromossomo 14 com as seguintes coordenadas: [*arr 14q11.2-q12 (21.819.565-24.578.066)x3*] (Figura 9). A *CNV* foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à duplicação de 57 genes codificantes, dos quais 14 apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Estudos de GWA não mostraram *locus* para altura humana nessa região até o momento.

Figura 9 - Imagem do *array-CGH* do paciente 6: todo o cromossomo 14 à esquerda e a região duplicada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas duplicadas em relação ao controle estão representadas em azul

No DECIPHER foram encontradas descrições de sete pacientes com duplicações que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura foi descrita como achado clínico em um destes; entretanto, em quatro as características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na duplicação da paciente 5, quatro apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*MMP14*, *Slc7a7*, *DAD1*, *CHD8*).

Paciente 7

A paciente 7 foi a única filha de pais não consanguíneos, nascida após uma gestação sem intercorrências. Na primeira avaliação em nosso serviço, estava com 19 anos de idade e já apresentava altura final de 147,2 (Escore-Z de altura -2,5). Sua história pregressa era de baixa estatura proporcional de início pré-natal acompanhada de asplenia, disgenesia de corpo caloso, estenose pulmonar, comunicação interatrial, escoliose, atraso de DNPM, deficiência intelectual (Tabela 9). Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) havia sido previamente realizada sem elucidação etiológica (Tabela 10).

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma duplicação terminal de 4,4 Mb no cromossomo 16 com as seguintes coordenadas: [*arr 16q24.1-q24 (85.678.593-90.148.400)X3*] (Figura 10). A *CNV* foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à duplicação de 59 genes codificantes, dos quais sete apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Na análise de estudos de GWA, observamos que o consórcio GIANT evidenciou dois loci com influência na altura humana contidos na região cromossômica duplicada nesta paciente. Os *SNPs* identificados nestes loci e os genes mais próximos e mais provavelmente relacionados a estes *SNPs* foram os seguintes: rs8052560 com o gene da galactosamina 6-sulfatase (*GALNS*) e o gene da subunidade 2 da tiouridilase citosólica (*CTU2*) e rs154663 com o gene da proteína associada à espermatogênese 33 (*SPATA33* ou *C16orf55*)

Figura 10 - Imagem do *array-CGH* da paciente 7: todo o cromossomo 16 à esquerda e a região duplicada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas duplicadas em relação ao controle estão representadas em azul

No DECIPHER foram encontradas descrições de 16 pacientes com duplicações que se sobrepõem à encontrada em nossa paciente. Baixa estatura com história de RCIU foi descrita como achado clínico em um destes; entretanto, em 10 as características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na duplicação da paciente 7, sete apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*FOXC2*, *FANCA*, *APRT*, *FOXL1*, *GALNS*, *ANKRD11*, *ZFPM1*). Na análise do OMIM, todos os 59 genes incluídos na duplicação do paciente 7 fazem parte da região de STQTL número 22 (#613547).

Paciente 8

O paciente 8 foi o primeiro filho, de uma prole de três, de pais não consanguíneos. Na primeira avaliação em nosso serviço, apresentava quadro de baixa estatura proporcional de início pré-natal com outras importantes características clínicas (Tabela 9), incluindo microcefalia, CIV, assimetria corporal, atraso de DNPM e deficiência intelectual. Abordagem diagnóstica para baixa estatura (Tabelas 2 e 3) foi realizada sem elucidação etiológica. Apresentava discreto atraso da idade óssea e concentrações séricas normais de IGF-1 e IGFBP3 (Tabela 10). Tratamento com rhGH (0,15 U/kg/dia) foi feito sem resposta efetiva, sendo suspenso após um ano e seis meses de uso. O paciente se manteve com baixa estatura sem recuperação (escore-Z de altura -3,0), fora de seu canal familiar de crescimento.

Realizado *aCGH*, foi encontrada uma duplicação intersticial de 1,9 Mb no cromossomo X com as seguintes coordenadas: [*arr Xq13.1-q13.2 (71.553.894-73.461.083)x3*] (Figura 11). A CNV foi ausente nos pais; com ocorrência *de novo*; e levou à duplicação de 14 genes codificantes, dos quais cinco apresentam funções relacionadas com ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento (Tabela 7). Estudos de GWA não mostraram lócus para altura humana nessa região até o momento.

No DECIPHER foram encontradas descrições de nove pacientes com duplicações que se sobrepõem à encontrada em nosso paciente. Baixa estatura não foi descrita em nenhum destes; entretanto, em dois as

características fenotípicas não foram descritas. Dentre os genes contidos na duplicação do paciente 8, três apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*HDAC8*, *CDX4*, *XIST*).

Figura 11 - Imagem do *array-CGH* da paciente 8: todo o cromossomo X à esquerda e a região duplicada vista em maior aumento à direita. As imagens mostram o $\log_2$ da razão paciente/referência alocado em relação à posição cromossômica. As sondas duplicadas em relação ao controle estão representadas em azul

5 DISCUSSÃO

A pesquisa de variações no número de cópias de segmentos cromossômicos tem revelado o importante papel destas alterações genômicas na diversidade populacional, na etiologia de doenças humanas ⁽²¹⁾ e na variabilidade de altura na população geral ⁽⁴⁰⁾. O modelo de associação de CNVs a doenças envolve deleções e/ou duplicações individualmente raras (<1% frequência), mas com segmentos cromossômicos de tamanhos relevantes (> 100 kb). Estas variações, em geral, estão sob forte pressão de seleção, ocorrem na população principalmente por eventos *de novo* e costumam persistir por apenas algumas gerações ⁽²¹⁾.

Entre os diversos traços e doenças com causas genéticas, destaca-se a baixa estatura, um fenótipo com diferentes formas de apresentação. O entendimento das bases genéticas da baixa estatura tem importância primordial para o diagnóstico clínico, o prognóstico e o aconselhamento genético dos indivíduos afetados, bem como para o entendimento dos mecanismos e das vias regulatórias do crescimento humano. Em termos clínicos, o retardo de crescimento é classificado como de início pré-natal (intrauterino) ou de início pós-natal, uma vez que a história natural e o diagnóstico diferencial destas duas formas se diferenciam. Os estudos moleculares até então disponíveis sugerem que isto ocorra por diferenças nos mecanismos regulatórios do crescimento intrauterino e pós-natal. Os pacientes com baixa estatura de início pré-natal, quando excluídas doenças

relacionadas com a gestação, constituem um grupo heterogêneo com quadros clínicos complexos frequentemente resultantes de alterações genéticas, que, desde o período intrauterino, rompem os mecanismos e as vias de desenvolvimento e de crescimento fetal normais. Assim sendo, propusemos a hipótese de que variações de número de cópias cromossômicas raras poderiam estar entre as causas genéticas de baixa estatura de início pré-natal. Em estudo recente, com análise de dados semelhante à de nosso trabalho, Zahnleiter et al. identificaram CNVs patogênicas em 20 entre 200 pacientes (10%) com baixa estatura sem causa definida; oito destes pacientes eram nascidos PIG ⁽⁴¹⁾. Em outro estudo também com análise semelhante à nossa, a pesquisa de CNVs em 162 pacientes com baixa estatura de causa desconhecida, considerando a segregação familiar, revelou ao menos 17 (10,4%) variantes patogênicas ⁽⁴²⁾. Em ambos estudos, os pacientes foram selecionados sem considerar história pregressa de comprometimento de peso e/ou comprimento ao nascimento.

Em nosso estudo, investigamos 51 pacientes com baixa estatura de início pré-natal com características dismórficas e/ou atraso de DNPM, uma condição com etiologia heterogênea. Em oito destes pacientes (16%), encontramos raras CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas, indicando que perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos podem ser comuns nesta população. Esta taxa é comparável com as taxas de CNVs patogênicas em condições clínicas para as quais as técnicas de

cariotipagem molecular são os testes diagnósticos de primeira escolha, incluindo atraso de DNPM e múltiplas anomalias congênitas ⁽⁹⁾.

As CNVs categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em nossos resultados, ou seja, causadoras de doença, apresentam critérios padronizados como deletérios ^(9, 22). As nove variações, presentes nos pacientes 1 a 8, são *de novo*; são ricas em conteúdo gênico (número de genes); tem tamanho significativo; e afetam genes com funções envolvidas em ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento. Mais ainda, as deleções dos pacientes 1, 2 e 3 representam síndromes de microdeleções descritas e estabelecidas na literatura. Nossos resultados mostraram que, nestes oito pacientes, a técnica de *array-CGH* permitiu a elucidação do diagnóstico clínico e das bases genéticas envolvidas na baixa estatura de início pré-natal, não suspeitados antes da análise de número de cópias cromossômicas submicroscópicas.

Apesar disto, as variações patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas ocorreram em diferentes loci de diferentes cromossomos, resultado compatível com os diferentes fenótipos apresentados por estes pacientes nascidos PIG selecionados. A variabilidade genética dos resultados do estudo explica a variabilidade clínica dos pacientes. Vale ressaltarmos que a mesma variabilidade genética foi observada nas CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas nos dois estudos mencionados acima ^(41, 42).

É importante considerarmos que as CNVs classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas neste estudo provavelmente

representam uma subestimativa: *CNVs* presentes em pacientes e herdadas de um progenitor clinicamente normal podem ainda contribuir para o fenótipo anormal. Relatos deste fenômeno foram bem documentados na literatura, incluindo deleções 1q21 associadas à Síndrome de TAR ⁽⁴³⁾ ou deleções 16p12 associadas ao autismo e à aplasia Mülleriana ⁽⁴⁴⁾. Adicionalmente, é importante considerarmos também que a técnica de *aCGH* não detecta casos de dissomia uniparental, uma causa conhecida de baixa estatura em crianças nascidas PIG.

A seguir discutiremos detalhadamente os resultados da análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações patogênicas e provavelmente patogênicas realizada em nosso estudo com o objetivo de estabelecer uma relação causal genótipo-fenótipo e identificar genes associados a baixa estatura de início pré-natal. Os cinco primeiros resultados da análise discutidos envolvem quadros de perdas de número de cópias cromossômicas encontradas através do *aCGH* (pacientes 1 a 5); enquanto os três resultados seguintes envolvem quadros de ganhos (pacientes 6 a 8). Até recentemente, a interpretação das duplicações era considerada desafiadora na literatura. Entretanto, estudos atuais apontam a validade das diretrizes para sua interpretação, evidenciando sua relevância clínica ⁽⁴⁵⁾.

5.1 DELEÇÃO 22q11.21 PRESENTE NA PACIENTE 1

A deleção 22q11.21, apresentada pela paciente 1, é compatível com a síndrome de deleção 22q11.2 (ou Síndrome de DiGeorge; OMIM #188400). Esta patologia é uma das síndromes de múltiplas anomalias mais comuns em humanos, com prevalência estimada de 1:2.000 a 1:4.000 nascidos vivos. Nenhuma característica clínica única ocorre em 100% dos afetados; não há relatos de pacientes com todos os possíveis achados; e nenhum dos sinais ou sintomas é obrigatório para diagnóstico. Apresenta fenótipo com expressão altamente variável com mais de 180 achados distintos descritos em diversos órgãos e sistemas, o que dificulta seu diagnóstico apenas por bases clínicas ⁽⁴⁶⁾.

Baixa estatura na infância é relatada em 10 a 60% dos casos, dependendo da casuística, tendo sido descrita recentemente como manifestação primária da síndrome ⁽⁴⁷⁾. Em aproximadamente 26% destes pacientes com baixa estatura, o fator associado é o retardo de crescimento na vida intra-uterina que persiste na vida pós-natal ⁽⁴⁸⁾. Nossos resultados da análise feita no DECIPHER concordam com esta observação. Encontramos 11 pacientes, com deleções que se sobrepunham à deleção de nossa paciente 1, com relato de baixa estatura de início pré-natal.

Com o avanço das técnicas de cariotipagem molecular, o número de casos diagnosticados de síndrome de deleção 22q11.2 tem aumentado significativamente na prática clínica, fazendo esta variação ser considerada atualmente a principal síndrome de microdeleção em humanos ⁽⁴⁹⁾.

Recentemente alguns genes, contidos na região deletada em heterozigose, tem sido relacionados com os fenótipos da síndrome: *TBX1* (malformações cardíacas associadas ou não com outras características fenotípicas), *COMT* e *PRODH* (doenças psiquiátricas), *DGCR* (genes da região crítica da síndrome de DiGeorge) ⁽⁴⁶⁾. Todos estes estão contidos na deleção de nossa paciente 1, que apresentou quadro clínico atípico em relação ao quadro clássico da síndrome (malformações cardiovasculares, imunodeficiências e hipocalcemia congênita) descrito no passado. Os motivos pelos quais grande parte dos pacientes desenvolvem quadros clínicos variáveis ainda não estão esclarecidos e são fonte de pesquisa atual. A variabilidade da expressão da síndrome ocorre mesmo com aqueles fenótipos com causa genética identificada ⁽⁴⁶⁾. Vale ainda ressaltarmos que a deleção 22q11.2 foi a única *CNV* patogênica identificada em comum tanto em nosso estudo como nos outros dois estudos recentes de análise de *CNVs* em pacientes com baixa estatura de causa desconhecida ^(41, 42), apontando para sua possível recorrência nestes casos.

Até o presente momento, não há um gene específico contido na deleção 22q11.2 associado ao crescimento e determinação da altura. Entretanto, entre os genes contidos na deleção da paciente 1, 24 tem funções envolvidas em ciclo celular, vias de crescimento celular e/ou processos de desenvolvimento. Entre estes 24, cinco genes apresentaram modelos animais de camundongos nocaute com retardo de crescimento fetal e/ou crescimento afetado (*CRKL* ⁽⁵⁰⁾, *HIRA* ⁽⁵¹⁾, *TBX1* ⁽⁵²⁾, *TXNRD2* ⁽⁵³⁾, *RANBP1*) ⁽⁵⁴⁾, sugerindo seu envolvimento neste fenótipo. *CRKL*, *HIRA* e

RANBP1 destacam-se por apresentarem alta probabilidade de relação com fenômeno de haploinsuficiência em modelos de predição ⁽⁵⁵⁾.

5.2 DUPLICAÇÃO 10q26.2-q26.3 E DELEÇÃO 10q26.3 PRESENTES NA PACIENTE 2

A deleção terminal 10q26.3, apresentada pela paciente 2, é compatível com a síndrome de deleção 10q26 (OMIM #609625). As deleções deste locus cromossômico são consideradas eventos raros, existindo pouco mais de 15 casos descritos na literatura desde o primeiro caso relatado em 1978. Apesar disto, os pacientes descritos compartilhavam características fenotípicas distintas (também presentes em nossa paciente): baixa estatura (descrita como de início pré-natal em parte do grupo); microcefalia ao nascimento; estrabismo; surdez ou malformações nas orelhas; assimetria facial; face triangular; atraso de DNPM; deficiência intelectual leve ou moderada; e alterações de comportamento. Assim sendo, Wulfsberg et al. em 1989 ⁽⁵⁶⁾, Schrandt-Stumpel et al. em 1991 ⁽⁵⁷⁾ e Irving et al. em 2003 ⁽⁵⁸⁾ sugeriram a existência de uma síndrome de deleção 10q26 distinta, atualmente descrita como uma síndrome de deleção de genes contíguos.

Com o avanço das técnicas de cariotipagem molecular, novos pacientes portadores de deleção heterozigota desta região estão sendo identificados, como observamos em nossa análise do DECIPHER. Até o presente momento, não há um gene específico contido na deleção 10q26

associado à altura. Na análise de bioinformática para caracterização dos genes contidos na deleção da paciente 2, o gene da glutaredoxina 3 (*GLRX3*, OMIM # 612754) surge como o principal gene candidato desta abordagem: 1) apresentou modelo animal nocaute com crescimento afetado e defeitos morfológicos ⁽⁵⁹⁾; 2) estava deletado em nove dos 11 pacientes descritos no DECIPHER com deleções que se sobrepunham à deleção de paciente 2 e baixa estatura de início pré-natal; 3) codifica uma enzima oxidoreductase (membro da família glutaredoxina) com papel no crescimento celular e na modulação da proteína quinase C.

A duplicação 10q26.2-q26.3 apresentada pela paciente 2 é um evento ainda mais raro do que sua deleção terminal. Recentemente, com o uso das técnicas de citogenética molecular, pacientes portadores de duplicação nesta região estão sendo identificados, conforme observamos em nossa análise do DECIPHER. Até o presente momento, não há um gene específico contido neste segmento associado à altura.

5.3 DELEÇÃO 4q28.2-q31.21 PRESENTE NO PACIENTE 3

A deleção intersticial 4q28.2-q31.21 encontrada no paciente 3 se sobrepõe às coordenadas genômicas da síndrome de deleção 4q, uma desordem cromossômica rara com incidência estimada em 1:100.000 indivíduos e aproximadamente 150 casos relatados na literatura até o momento. Deleções intersticiais e terminais do braço longo do cromossomo

14 tem sido descritas com diversas condições clínicas afetando múltiplos órgãos e sistemas ⁽⁶⁰⁾. Baixa estatura de início pré ou pós-natal é relatada em aproximadamente 50% dos casos, mas a região crítica responsável pelo prejuízo de crescimento permanece desconhecida. Na análise de bioinformática de nosso estudo, identificamos o gene da proteína de ligação 1 associada ao GRB2 (*GAB1*, OMIM # 604439) como o principal gene candidato envolvido no fenótipo de crescimento. A proteína codificada por este gene tem papel chave em vias de sinalização de fatores de crescimento e de citocinas, incluindo a via de sinalização do receptor de insulina ⁽⁶¹⁾. O *GAB1* 1) estava deletado em um paciente do DECIPHER com baixa estatura e deleção que se sobrepunha à do paciente 3; 2) teve modelo animal com nocaute com crescimento afetado ⁽⁶¹⁾; 3) está entre os 23 genes deletados incluídos na STQTL12; e 4) modelos de predição indicam probabilidade média de ter relação com fenômeno de haploinsuficiência ⁽⁵⁵⁾.

5.4 DELEÇÃO 3q27.1-27-3 PRESENTE NA PACIENTE 4

A deleção 3q27.1-27-3, apresentada pela paciente 4, é um evento raro com apenas cinco casos descritos na literatura até o momento com deleções semelhantes ^(62, 63). Recentemente, novos pacientes portadores de deleção heterozigota desta região estão sendo identificados, conforme observamos em nossa análise do DECIPHER.

O gene *IGF2BP2* (OMIM #608289), deletado em heterozigose na paciente 4, foi identificado, no estudo de associação global do genoma GIANT, como associado à altura ⁽³⁹⁾. Este gene estava deletado nos quatro pacientes do DECIPHER com deleções que se sobrepunham à da paciente 4 e baixa estatura de início pré-natal, sendo que dois destes são parte dos casos descritos na literatura ⁽⁶³⁾. Não há modelo animal nocaute do *IGF2BP2* até o momento, porém ele surge como o principal gene candidato envolvido no controle genético do crescimento na análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico desta paciente. Polimorfismos deste gene são frequentemente também relacionados com diabetes mellitus tipo 2 e com diabetes gestacional em estudos de associação global do genoma.

O *IGF2BP2* codifica uma proteína pertencente à família de proteínas ligadoras ao mRNA do IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*). O IGF-2 é um fator com atividade promotora de desenvolvimento e crescimento conhecido de longa data. Tem papel predominante no crescimento fetal inicial e modelo animal nocaute de seu gene apresentou restrição de crescimento. A proteína IGF2BP2 está envolvida na localização, na estabilidade e na tradução do RNA deste fator de crescimento; é considerada essencial para o crescimento e desenvolvimento embriônicos; e se expressa principalmente no desenvolvimento, mas também em órgãos adultos. Modelos de predição indicam alta probabilidade deste gene ter relação com fenômeno de haploinsuficiência ⁽⁵⁵⁾.

5.5 DELEÇÃO 20p13 PRESENTE NA PACIENTE 5

A deleção 20p13, apresentada pela paciente 5, é um evento raro, havendo poucos casos de deleções intersticiais 20p na literatura. Até o momento, dois pacientes apenas foram descritos com deleções que se sobrepunham à da paciente 5. Ambos apresentavam quadro clínico semelhante ao de nossa paciente, incluindo baixa estatura de início pré-natal. Os demais casos relatados de deleções intersticiais 20p13 incluíam segmentos genômicos significativamente maiores que o da paciente 5, compondo a chamada síndrome de Alagille⁽⁶⁴⁾, na qual ela não se enquadra.

Até o presente momento, não há um gene específico contido neste segmento associado à altura. Entretanto, em nossa análise de bioinformática, identificamos o gene da caseína-quinase II, alfa-1 (*CSNK2A1*, OMIM # 115440) como o principal gene candidato envolvido no fenótipo de déficit de crescimento: 1) estava deletado na paciente do DECIPHER com deleção que se sobrepunha à da paciente 5 e baixa estatura de início pré-natal; 2) seu modelo animal com nocaute apresentou defeitos de extremidades com crescimento afetado⁽⁶⁵⁾; e 3) modelos de predição indicam alta probabilidade de ter relação com fenômeno de haploinsuficiência⁽⁵⁵⁾. O *CSNK2A1* codifica a subunidade catalítica de uma proteína quinase serina/treonina, denominada caseína quinase II. Esta proteína participa da sinalização da via Wnt e regula fatores de transcrição envolvidos nos processos do ciclo celular.

5.6 DUPLICAÇÃO 14q11.2-q12 PRESENTE NA PACIENTE 6

A duplicação 14q11.2-q12, apresentada pela paciente 6, é um evento raro, havendo poucos casos descritos na literatura. A maioria das duplicações relatadas envolvendo este locus cromossômico foram herdadas de genitores com translocações balanceadas e abrangiam segmentos maiores dos que a variação da nossa paciente. Vale destacar, no entanto, que o fenótipo característico dos pacientes relatados compreendia baixa estatura, atraso de DNPM, microcefalia e anomalias faciais leves ⁽⁶⁶⁾.

Até o presente momento, não há um gene específico contido neste segmento associado à altura. Em nossa análise de bioinformática da duplicação da paciente 6, o gene da proteína 8 de ligação ao cromodomínio helicase-DHA (*CHD8*, OMIM # 610528), surgiu como o principal candidato para envolvimento com o fenótipo de déficit de crescimento. Este gene apresentou modelo animal nocaute com retardo de crescimento intrauterino ⁽⁶⁷⁾ e estava duplicado no paciente do DECIPHER com duplicação que se sobrepunha à duplicação de paciente 6 e baixa estatura de início pré-natal. O *CHD8* codifica uma DNA helicase (proteína repressora da transcrição), que se liga à beta-catenina e age regulando negativamente a via de sinalização Wnt, a qual tem importante papel no desenvolvimento e na morfogênese dos vertebrados.

5.7 DUPLICAÇÃO 16q24.1-q24 PRESENTE NA PACIENTE 7

A duplicação 16q24.1-q24, carregada pela paciente 7, é um evento muito raro na literatura, não havendo relatos de casos semelhantes ao da paciente avaliada neste estudo. Entretanto, em nossa análise de bioinformática, encontramos que toda a região genômica duplicada nesta paciente é parte da STQTL22 (OMIM #613547).

Entre os 59 genes codificantes duplicados nesta CNV, três foram identificados como associados à altura humana em estudos de associação global do genoma: *GALNS* (OMIM # 612222)⁽³⁹⁾, *CTU2*⁽³⁹⁾ e *SPATA 3*⁽⁶⁸⁾. Entre eles, o *GALNS* surge como o principal gene candidato para fenótipo de déficit de crescimento. O gene codifica a galactosamina 6-sulfatase, uma enzima lisossômica necessária à degradação de glicosaminoglicanos, de sulfato de queratina e de sulfato de condroitina. A deficiência desta enzima leva à mucopolissacaridose tipo IV, uma doença de estoque lisossômico⁽⁶⁹⁾. O modelo animal nocaute do gene *GALNS* apresenta crescimento afetado por alteração esquelética⁽⁷⁰⁾.

CTU2 e *SPATA33* codificam proteínas com funções desconhecidas até o momento, tampouco apresentam modelos animais para comparação.

5.8 DUPLICAÇÃO Xq13.1-q13.2 PRESENTE NO PACIENTE 8

A duplicação Xq13.1-q13.2 encontrada no paciente 8 é uma condição rara, que coincide parcialmente com duplicações encontradas em outros 12 casos relatados na literatura. Todos estes pacientes foram descritos clinicamente com déficit de crescimento ⁽⁷¹⁾.

Até o presente momento, não há um gene específico contido neste segmento associado à altura. Em nossa análise de bioinformática, identificamos o microRNA 421 (*mir421*) como o principal gene candidato envolvido no fenótipo de crescimento do paciente 8. Um estudo recente mostrou que os níveis de *mir421* são inversamente correlacionados com os níveis do gene *mothers against DPP homolog 4* (*SMAD4*, OMIM #600993), evidenciando que o microRNA 421 funciona como um regulador negativo da expressão deste gene alvo ⁽⁷²⁾. O *SMAD4* codifica uma proteína com papel essencial na transdução de sinal de duas vias de fatores de crescimento: via das proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins, BMP*) e via do fator de crescimento transformador β (*transforming growth factor β , TGF β*). Em outro estudo recente, mutações heterozigotas *missense* no *SMAD4* foram descritas como causadoras da chamada Síndrome de Myhre (OMIM # 139210) em pacientes que preenchem os critérios clínicos para o síndrome ⁽⁷³⁾. Síndrome de Myhre é um desordem rara do desenvolvimento e interessante seu fenótipo se assemelha com importantes achados clínicos encontrados em nosso paciente 8: baixa estatura de início pré-natal, microcefalia, dismorfismos faciais, alterações esqueléticas, atraso de DNPM,

cardiopatias congênitas e criptorquidia. Assim sendo, após a caracterização funcional do paciente 8, nossa hipótese é de que a duplicação encontrada poderia ter um efeito de ganho-de-função no *mir421*, que poderia ter aumentando seu efeito de regulação negativa na expressão do *SMAD4*, levando a um quadro clínico em nosso paciente semelhante àquele da Síndrome de Myhre.

6 CONCLUSÕES

A frequência de CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas no estudo foi de 16%, comparável às taxas de CNVs patogênicas em condições clínicas para as quais as técnicas de cariotipagem molecular são os testes diagnósticos de primeira escolha.

Variações no número de cópias cromossômicas raras estão entre as causas genéticas de baixa estatura de início pré-natal.

Em oito pacientes selecionados, a técnica de *array-CGH* permitiu a elucidação do diagnóstico clínico e das bases genéticas envolvidas na persistência de déficit de crescimento pós-natal. Nossos resultados corroboram as evidências atuais da importância da análise global do número de cópias genômicas como um teste genético-clínico para elucidação diagnóstica em pacientes com distúrbios de crescimento.

No presente estudo, foram encontradas CNVs em diferentes regiões cromossômicas, com diferentes genes candidatos, que podem estar envolvidos nos mecanismos de regulação do crescimento e/ou nas vias regulatórias de desenvolvimento intrauterino.

7 REFERÊNCIAS

1. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas*. 1956;42:1-6.
2. Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*. 1968 Jan;49(1):219-22.
3. Van Prooijen-Knegt AC, Van Hoek JF, Bauman JG, Van Duijn P, Wool IG, Van der Ploeg M. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. *Exp Cell Res*. 1982 Oct;141(2):397-407.
4. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*. 2002 Oct;3(10):769-78.
5. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
6. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8.
7. Funari MF, Jorge AA, Souza SC, Billerbeck AE, Arnhold IJ, Mendonca BB, Nishi MY. Usefulness of MLPA in the detection of SHOX deletions. *Eur J Med Genet*. 2010;53(5):234-8.

8. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
9. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.
10. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today.* 2008 Sep;13(17-18):760-70.
11. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar;92(3):804-10.
12. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics.* 2003 Jun;111(6 Pt 1):1253-61.

13. Boguszewski MC, Mericq V, Bergada I, Damiani D, Belgorosky A, Gunczler P, Ortiz T, Llano M, Domené HM, Calzada-León R, Blanco A, Barrientos M, Procel P, Lanes R, Jaramillo O. Latin American consensus: children born small for gestational age. *BMC Pediatr*. 2011; 11:66.
14. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, Lambert A, Papageorgiou AT, Carvalho M, Jaffer YA, Gravett MG, Purwar M, Frederick IO, Noble AJ, Pang R, Barros FC, Chumlea C, Bhutta ZA, Kennedy SH; International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st). International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*. 2014 Sep 6;384(9946):857-68.
15. Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Postnatal growth of children born small for gestational age. *Acta Paediatr Suppl*. 1997 Nov;423:193-5.
16. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res*. 1995 Aug;38(2):267-71.
17. Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Sep;99(9):3080-92.
18. Hall JG. Review and hypothesis: syndromes with severe intrauterine growth restriction and very short stature--are they related to the epigenetic mechanism(s) of fetal survival involved in the developmental origins of adult health and disease? *Am J Med Genet A*. 2010 Feb; 152A(2):512-27.
19. Wit JM, Kiess W, Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Feb;25(1):1-17.

-
20. Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet*. 2004 Oct;66(4):265-75.
 21. Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet*. 2011;45:203-26.
 22. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet*. 2007 Jul; 39(7 Suppl):S48-54.
 23. Aboura A, Dupas C, Tachdjian G, Portnoi MF, Bourcigaux N, Dewailly D, Frydman R, Fauser B, Ronci-Chaix N, Donadille B, Bouchard P, Christin-Maitre S. Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Nov;94(11): 4540-6.
 24. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, Saeed S, Hamilton-Shield J, Clayton-Smith J, O'Rahilly S, Hurles ME, Farooqi IS. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*. 2010 Feb 4;463(7281):666-70.
 25. Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers HH, Grueters A, Krude H, Ullmann R. Screening chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization in 80 patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jul;95(7):3446-52.
 26. Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, Kuechler A, Wieacker P. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(10):2637-46.

-
27. de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Geneviève D, Goldenberg A, Oufadem M, Manouvrier S, Munnich A, Vidigal JA, Vekemans M, Lyonnet S, Henrion-Caude A, Ventura A, Amiel J. Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nat Genet.* 2011 Oct;43(10):1026-30.
 28. Spengler S, Begemann M, Ortiz Bruchle N, Baudis M, Denecke B, Kroisel PM, Oehl-Jaschkowitz B, Schulze B, Raabe-Meyer G, Spaich C, Blümel P, Jauch A, Moog U, Zerres K, Eggermann T. Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with Silver-Russell features. *J Pediatr.* 2012 Nov;161(5):933-42.
 29. 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 Jun;74(6):901-10.
 30. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child.* 1966;41(219):454-71.
 31. Vasconcelos MM. [Mental retardation]. *J Pediatr (Rio J).* 2004 Apr;80(2 Suppl):S71-82.
 32. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.* 1969 Jun;44(235):291-303.
 33. Greulich WW, Pyle SI. *Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist.* Second Edition ed. Stanford:1959.

-
34. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
 35. Allemeersch J, Van Vooren S, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR, Moreau Y. An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:380.
 36. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009 Apr;84(4):524-33.
 37. Moreau Y, Tranchevent LC. Computational tools for prioritizing candidate genes: boosting disease gene discovery. *Nat Rev Genet.* 2012 Aug;13(8):523-36.
 38. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet.* 2009 Mar;10(3):184-94.
 39. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature.* 2010 Oct 14;467(7317):832-8.
 40. Dauber A, Yu Y, Turchin MC, Chiang CW, Meng YA, Demerath EW, Patel SR, Rich SS, Rotter JI, Schreiner PJ, Wilson JG, Shen Y, Wu BL, Hirschhorn JN. Genome-wide association of copy-number variation reveals an association between short stature and the presence of low-frequency genomic deletions. *Am J Hum Genet.* 2011 Dec 9;89(6):751-9.

-
41. Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, Hoyer J, Wiesener A, Wieczorek D, Kunstmann E, Reis A, Doerr HG, Rauch A, Thiel CT. Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genetics*. 2013 Mar;9(3):e1003365.
 42. van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, Oostdijk W, Gijsbers AC, Hoffer MJ, Karperien M, Walenkamp MJ, Noordam C, Voorhoeve PG, Mericq V, Pereira AM, Claahsen-van de Grinten HL, van Gool SA, Breuning MH, Losekoot M, Baron J, Ruivenkamp CA, Wit JM. Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet*. 2014 Sep 25;22(5):602-9.
 43. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007 Feb;80(2):232-40.
 44. Sandbacka M, Laivuori H, Freitas E, Halttunen M, Jokimaa V, Morin-Papunen L, Rosenberg C, Aittomäki K. TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Mullerian aplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):125.
 45. Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-Knol HE, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH, Leegte LK, Kok K, Sinke RJ, van Ravenswaaij-Arts CM. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet*. 2012 Feb;20(2):161-5.

-
46. Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Developmental disabilities research reviews*. 2008;14(1):3-10.
 47. Guzman ML, Delgado I, Lay-Son G, Willans E, Puga A, Repetto GM. Growth in Chilean infants with chromosome 22q11 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 Nov;158A(11):2682-6.
 48. Brauner R, Le Harivel de Gonneville A, Kindermans C, Le Bidois J, Prieur M, Lyonnet S, Souberbielle JC. Parathyroid function and growth in 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2003 May;142(5):504-8.
 49. Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS, Hummel M, Amato S, Tartaglia N, Berg J, Sutton VR, Lalani SR, Chinault AC, Cheung SW, Lupski JR, Patel A. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Jan;82(1):214-21.
 50. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):293-8.
 51. Maynard TM, Gopalakrishna D, Meechan DW, Paronett EM, Newbern JM, LaMantia AS. 22q11 Gene dosage establishes an adaptive range for sonic hedgehog and retinoic acid signaling during early development. *Hum Mol Genet*. 2013 Jan 15;22(2):300-12.
 52. Hu T, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development*. 2004 Nov;131(21):5491-502.

-
53. Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol*. 2004 Nov;24(21):9414-23.
 54. Nagai M, Moriyama T, Mehmood R, Tokuhiko K, Ikawa M, Okabe M, Tanaka H, Yoneda Y. Mice lacking Ran binding protein 1 are viable and show male infertility. *FEBS Lett*. 2011 Mar 9;585(5):791-6.
 55. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME. Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS genetics*. 2010 Oct; 6(10):e1001154.
 56. Wulfsberg EA, Weaver RP, Cuniff CM, Jones MC, Jones KL. Chromosome 10qter deletion syndrome: a review and report of three new cases. *American journal of medical genetics*. 1989 Mar;32(3):364-7.
 57. Schrander-Stumpel C, Fryns JP, Hamers G. The partial monosomy 10q syndrome: report on two patients and review of the developmental data. *Journal of mental deficiency research*. 1991 Jun;35 (Pt 3):259-67.
 58. Irving M, Hanson H, Turnpenny P, Brewer C, Ogilvie CM, Davies A, Berg J. Deletion of the distal long arm of chromosome 10; is there a characteristic phenotype? A report of 15 de novo and familial cases. *Am J Med Genet A*. 2003 Dec 1;123A(2):153-63.
 59. Cha H, Kim JM, Oh JG, Jeong MH, Park CS, Park J, Jeong HJ, Park BK, Lee YH, Jeong D, Yang DK, Bernecker OY, Kim do H, Hajjar RJ, Park WJ. PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Dec;45(6):796-803.

-
60. Strehle EM, Yu L, Rosenfeld JA, Donkervoort S, Zhou Y, Chen TJ, Martinez JE, Fan YS, Barbouth D, Zhu H, Vaglio A, Smith R, Stevens CA, Curry CJ, Ladda RL, Fan ZJ, Fox JE, Martin JA, Abdel-Hamid HZ, McCracken EA, McGillivray BC, Masser-Frye D, Huang T. Genotype-phenotype analysis of 4q deletion syndrome: proposal of a critical region. *Am J Med Genet A*. 2012 Sep;158A(9):2139-51.
 61. Itoh M, Yoshida Y, Nishida K, Narimatsu M, Hibi M, Hirano T. Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol*. 2000 May;20(10):3695-704.
 62. Pollazzon M, Grosso S, Papa FT, Katzaki E, Marozza A, Mencarelli MA, Uliana V, Balestri P, Mari F, Renieri A. A 9.3 Mb microdeletion of 3q27.3q29 associated with psychomotor and growth delay, tricuspid valve dysplasia and bifid thumb. *Eur J Med Genet*. 2009 Mar-Jun;52(2-3):131-3.
 63. Mandrile G, Dubois A, Hoffman JD, Uliana V, Di Maria E, Malacarne M, Coviello D, Faravelli F, Zwolinski S, Hellens S, Wright M, Forzano F. 3q26.33-3q27.2 microdeletion: a new microdeletion syndrome? *Eur J Med Genet*. 2013 Apr;56(4):216-21.
 64. McGill AK, Pastore MT, Herman GE, Alliman S, Rosenfeld JA, Weaver DD. A tale of two deletions: a report of two novel 20p13 --> pter deletions. *Am J Med Genet A*. 2010 Apr;152A(4):1000-7.
 65. Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C, Seldin DC. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan;28(1):131-9.

-
66. Monfort S, Blesa D, Rosello M, Orellana C, Oltra S, Cigudosa JC, Martinez F. Duplication of 14q11.2 associates with short stature and mild mental retardation: a putative relation with quantitative trait loci. *Am J Med Genet A*. 2007 Feb 15;143(4):382-4.
 67. Nishiyama M, Nakayama K, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Kikuchi A, Nakayama KI. Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(19):8386-94.
 68. Hao Y, Liu X, Lu X, Yang X, Wang L, Chen S, Li H, Li J, Cao J, Chen J, Li Y, Zhao L, Shi Y, Shen C, Yan W, He J, Huang J, Gu D. Genome-wide association study in Han Chinese identifies three novel loci for human height. *Hum Genet*. 2013 Jun;132(6):681-9.
 69. Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, Gravance CG, Orii T, Tomatsu S. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab*. 2013 Sep-Oct;110(1-2):54-64.
 70. Tomatsu S, Gutierrez M, Nishioka T, Yamada M, Tosaka Y, Grubb JH, Montañó AM, Vieira MB, Trandafirescu GG, Peña OM, Yamaguchi S, Orii KO, Orii T, Noguchi A, Laybauer L. Development of MPS IVA mouse (Galntm(hC79S.mC76S)slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 15;14(22):3321-35.
 71. Lugtenberg D, de Brouwer AP, Oudakker AR, Pfundt R, Hamel BC, van Bokhoven H, Bongers EM. Xq13.2q21.1 duplication encompassing the ATRX gene in a man with mental retardation, minor facial and genital anomalies, short stature and broad thorax. *Am J Med Genet A*. 2009 Feb 15;149A(4):760-6.

-
72. Hao J, Zhang S, Zhou Y, Liu C, Hu X, Shao C. MicroRNA 421 suppresses DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):552-7.
 73. Le Goff C, Mahaut C, Abhyankar A, Le Goff W, Serre V, Afenjar A, Destrée A, di Rocco M, Héron D, Jacquemont S, Marlin S, Simon M, Tolmie J, Verloes A, Casanova JL, Munnich A, Cormier-Daire V. Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nat Genet*. 2011 Jan;44(1):85-8.

8 APÊNDICE

Canton APM, Costa SS, Rodrigues TC, Bertola DR, Malaquias AC, Correa FA, Arnhold IJP, Rosenberg C, Jorge AAL. Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveals several candidate genes involved in growth pathways. *European Journal of Endocrinology*. 2014;171:253-262.

Clinical Study

A P M Canton and others

Copy number variants in SGA children

171:2

253-262

Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveals several candidate genes involved in growth pathways

Ana P M Canton, Sílvia S Costa¹, Tatiane C Rodrigues¹, Debora R Bertola^{1,2},
Alexsandra C Malaquias, Fernanda A Correa³, Ivo J P Arnhold³, Carla Rosenberg¹
and Alexander A L Jorge

Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM/25, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 5º Andar Sala 5340, CEP 01246-903 São Paulo, Brazil, ¹Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, Brazil, ²Unidade de Genética, Instituto da Criança, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-000 São Paulo, Brazil and ³Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brazil

Correspondence
should be addressed
to A A L Jorge
Email
alexj@usp.br

Abstract

Background: The etiology of prenatal-onset short stature with postnatal persistence is heterogeneous. Submicroscopic chromosomal imbalances, known as copy number variants (CNVs), may play a role in growth disorders.

Objective: To analyze the CNVs present in a group of patients born small for gestational age (SGA) without a known cause.

Patients and methods: A total of 51 patients with prenatal and postnatal growth retardation associated with dysmorphic features and/or developmental delay, but without criteria for the diagnosis of known syndromes, were selected. Array-based comparative genomic hybridization was performed using DNA obtained from all patients. The pathogenicity of CNVs was assessed by considering the following criteria: inheritance; gene content; overlap with genomic coordinates for a known genomic imbalance syndrome; and overlap with CNVs previously identified in other patients with prenatal-onset short stature.

Results: In 17 of the 51 patients, 18 CNVs were identified. None of these imbalances has been reported in healthy individuals. Nine CNVs, found in eight patients (16%), were categorized as pathogenic or probably pathogenic. Deletions found in three patients overlapped with known microdeletion syndromes (4q, 10q26, and 22q11.2). These imbalances are *de novo*, gene rich and affect several candidate genes or genomic regions that may be involved in the mechanisms of growth regulation.

Conclusion: Pathogenic CNVs in the selected patients born SGA were common (at least 16%), showing that rare CNVs are probably among the genetic causes of short stature in SGA patients and revealing genomic regions possibly implicated in this condition.

*European Journal of
Endocrinology*
(2014) **171**, 253–262

Introduction

Children born small for gestational age (SGA) are defined as those with birth weight and/or birth length at least 2 s.d. below the population mean for gestational age (1). The causes of prenatal growth impairment are often unclear

and involve maternal, placental, and/or fetal factors (1). Fetal factors include several genetic causes commonly characterized by persistent short stature, dysmorphic features, and developmental disorders (2). These genetic

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	254
----------------	-------------------------	--------------------------------------	-------	-----

syndromes of prenatal-onset growth impairment often encompass complex clinical disorders of difficult diagnosis (3).

Array-based genomic copy number analysis has recently become a research tool and a clinical genetic test in the diagnostic work-up of several clinical settings (4). One of the most used genomic copy number analysis types is array-based comparative genomic hybridization (aCGH), a technique used for genome-wide screening of submicroscopic segmental genomic gains and losses. This method enables a much higher resolution assay (greater than tenfold) of genomic imbalances than conventional cytogenetic methods (4, 5). The imbalances characterized by aCGH are called copy number variants (CNVs). A CNV is an imbalance of a genomic sequence that alters the diploid status of a particular locus in the human genome; essentially, it comprises deletions and duplications.

Currently, aCGH is indicated as a first-tier clinical diagnostic test in patients with unexplained developmental delay/intellectual disability, autism spectrum disorders, and multiple congenital anomalies (5). It is also becoming a powerful tool in the discovery of disease genes, identification of new syndromes, and delineation of known deletion/duplication syndromes, known as genomic disorders. In the field of endocrinology, genome-wide analysis of CNVs has been evaluated as a tool to identify genetic causes in several clinical conditions, including premature ovarian failure (6), severe early-onset obesity (7), congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis (8), ambiguous genitalia (9), skeletal defects with growth impairment (10), and Silver–Russell syndrome (11). Two recent studies have demonstrated the presence of causative and possible pathogenic CNVs in short-stature children (12, 13). However, in both studies, children were selected regardless of compromised birth weight and/or length.

In the present study, we performed aCGH in a group of 51 children born SGA with persistent short stature without a recognized cause of prenatal and postnatal growth impairment. Our results indicate that CNVs contribute to the genetic etiology of prenatal-onset short stature and reveal novel potential candidate genes and/or loci related to this condition.

Patients and methods

Patients

This study was approved by the Local Ethics Committee, and the patients and/or guardians gave their written

informed consent. Candidates for aCGH were selected from a total of 137 children followed at our outpatient clinic due to prenatal-onset short stature using the following criteria: i) birth weight and/or length s.d. ≤ -2.0 ; ii) persistent short stature after early infancy (height s.d. ≤ -2.0 at the age of 4 years or above); and iii) the presence of dysmorphic features, developmental delay, and/or intellectual disability, but without criteria for the diagnosis of a recognized syndrome, including Silver–Russell syndrome (14). The exclusion criteria for selection were as follows: i) placental and maternal known factors of intrauterine growth retardation, including placental structural or perfusional factors and maternal infections, substance use/abuse, or medical conditions and ii) known causes of short stature, including endocrinological diseases, skeletal dysplasias, hepatic diseases, systemic diseases, and established genetic diseases. All patients had normal G-banded karyotyping. A total of 51 patients, who fulfilled all inclusion criteria and no exclusion criteria, were selected for the molecular genetic study. Among these patients, 11 were investigated for demethylation of the paternal imprinting center region one on chromosome 11p15 and 14 were investigated for insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) and IGF1 receptor (*IGF1R*) mutations (15, 16). In all the selected patients, these molecular genetic tests proved to be normal.

Array-based comparative genomic hybridization

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes of all patients and 28 relatives (including 14 maternal samples, 11 paternal samples, and three other first-degree relatives' samples) using standard procedures. aCGH was performed in a whole-genome customized 60K oligonucleotide platform (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8×60K, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). The procedure was conducted according to the standard protocol of the manufacturer (17). Briefly, all standard quality assessments were implemented during DNA sample and array preparation. Microarray scanned images were processed using the Software Feature Extraction, version 10.7.3.1 (Agilent Technologies, Inc.). The Genomic Workbench 6.9 Software (Agilent Technologies, Inc.) was applied for calling CNVs using the Aberration Detection Method 2 analysis algorithm, with a sensitivity threshold of 6.7. To consider an aberration of a genomic segment as a duplication or a deletion, the log₂ ratio of cyanine 3:cyanine 5 intensities was used encompassing at least three probes. Ratios >0.3 were considered duplications, whereas ratios <-0.3 were considered deletions.

All hybridizations were gender-matched and processed in reverse-labeling duplicates, which means that all patients were evaluated twice for confirmation. CNVs not detected in both experiments were disregarded.

Copy number segment analysis

Detected CNVs >50 kb (5) were compared with CNV data from oligoarray studies documented in the Database of Genomic Variants (DGV) (18) and an independent control cohort of 400 healthy individuals with the same ethnic background, excluding common copy number polymorphisms (those with a frequency >1%). The assessment of CNV pathogenicity was made by considering the following four criteria based on previous studies: i) inheritance and familial segregation with the prenatal and postnatal growth impairment phenotype; ii) overlap with genomic coordinates for a known genomic imbalance syndrome; iii) overlap with CNVs defined in other patients, in particular, in those presenting prenatal-onset short stature reported in the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER) (19); and iv) gene content of coding genes associated with impaired developmental process and/or impaired cell growth pathways and/or growth impairment in animal models (4, 5). According to

this strategy, CNVs were categorized as pathogenic if they fulfilled all these criteria. CNVs were categorized as probably pathogenic if they fulfilled all these criteria, except the overlap with genomic coordinates for a known genomic imbalance syndrome. CNVs were categorized as probably benign mainly if they did not segregate with the prenatal and postnatal growth impairment phenotype in the patients' families. Finally, CNVs were categorized as variants of uncertain clinical significance (VUS) if they were unable to be classified in one of the three categories mentioned above (Fig. 1).

In an attempt to establish a causal genotype-phenotype correlation and to identify genes involved in growth impairment of prenatal onset, the gene content of the variants was analyzed using bioinformatics tools for gene prioritization (20). Gene annotation was performed using the University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC Genome Browser) (21). The assessment of gene function and overlap with genomic disorders was performed using the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and the PubMed databases. The assessment of microRNA function was performed using the miRBase (22) and the miRTarBase databases (23). A search for murine knockout phenotypes with growth impairment was carried out using the Mouse Genome Informatics (MGI) (24). Finally, gene prioritization to identify the most

Figure 1

Summary of study strategy with CNV identification and classification.

promising genes among the pool of candidates was performed using the Gene Distiller strategy (25) and the evaluation of putative links to other genes and biological pathways that have more established roles in the genetic control of growth.

Statistical analyses

The quantitative variables are expressed as means $\pm$ s.d. and were analyzed using unpaired Student's *t*-test or Kruskal–Wallis test, as appropriate. A *P* value <0.05 was considered to be statistically significant. All the statistical analyses were carried out using SigmaStat, version 3.5 (Windows, version 3.5; Systat Software, Inc., Erkrath, Germany).

Results

The cohort was characterized by a male predominance (63%). Among the patients, 34% were SGA just for length, 33% were SGA just for weight, and 33% were SGA for both weight and length. During the first evaluation, they presented a chronological age of 7.6 ± 3.7 years, with a marked short stature (height s.d. = -3.2 ± 0.8), even if corrected for parental height (height s.d. minus target height s.d. = -2.2 ± 1.2) (Table 1). The following clinical findings were most prevalent in the selected patients:

Table 1 Clinical characterization of the 51 selected patients with prenatal-onset short stature. Numeric values are shown as means $\pm$ s.d.; categorical values are shown as absolute numbers and percentages.

	Selected patients
Gender (M:F)	32:19
Preterm:term birth	14:37
Birth weight s.d. ≤ -2	30 (59%)
Birth length s.d. ≤ -2	32 (63%)
Target height s.d.	-1.0 ± 1.0
Father height s.d. ≤ -2	9 (17%)
Mother height s.d. ≤ -2	6 (12%)
Age during the first evaluation	7.6 ± 3.7
Height s.d.	-3.2 ± 0.8
Developmental delay	18 (25%)
Intellectual disability	5 (9.8%)
Microcephaly ^a	19 (37%)
Heart defects	7 (14%)
Skeletal defects	21 (41%)
Dysmorphic features ^b	37 (73%)

^aHead circumference s.d. < -2 .

^bTriangular face, high-arched palate, pectus excavatum, facial and/or body asymmetry, cryptorchidism, dysplastic ears, hypertelorism, epicanthus, short neck, and strabismus.

dysmorphic features (triangular face, hypertelorism, epicanthus, strabismus, dysplastic ears, high-arched palate, short neck, pectus excavatum, facial and/or body asymmetry, and cryptorchidism) in 73%; nonspecific skeletal abnormalities in 41%; microcephaly in 37%; and developmental delay in 25%. Among the selected patients, 60% did not fulfill the established criteria to indicate aCGH, according to clinical indications in the current literature (5).

In 17 of the 51 patients screened (33%), 18 rare CNVs were identified. Nine variants were deletions (ranging from 0.17 to 15.1 Mb) and nine were duplications (ranging from 0.26 to 4.4 Mb). None of these CNVs was found in our reference set of 400 controls or was considered a copy number polymorphism in comparison with DGV studies. The aCGH of parental DNA revealed that ten patients had *de novo* variants, whereas four patients inherited variants from a healthy parent. Parental DNA samples were not available for analysis in three patients.

Four distinct CNVs, found in three patients, were classified as pathogenic (patients 1–3; Tables 2 and 3 and Supplementary Fig. 1, see section on supplementary data given at the end of this article), while five distinct CNVs, found in five patients, were classified as probably pathogenic (patients 4–8; Tables 2 and 3 and Supplementary Fig. 1). All the identified pathogenic and probably pathogenic CNVs were *de novo* and gene rich. The complete list of all genes, including microRNA genes, observed in CNV regions is given in Supplementary Table 1. Eight of them overlap with CNVs defined in other patients with prenatal-onset short stature reported in the DECIPHER (Table 2). Deletions found in patient 1 (22q11.21 deletion), patient 2 (10q26.3 deletion), and patient 3 (4q deletion) overlap with known deletion syndromes (26, 27, 28). In these CNVs categorized as pathogenic or probably pathogenic, several candidate genes were identified (including one microRNA; Table 2). Patients born SGA with pathogenic or probably pathogenic CNVs have heterogeneous phenotypes (Table 3), mainly presenting with nonfamilial short stature ($n=8/8$), microcephaly ($n=5/8$), developmental delay ($n=4/8$), and body/facial asymmetry ($n=3/8$).

Copy number changes found in patients 9–12 were considered VUS (Supplementary Table 2, see section on supplementary data given at the end of this article). Parental DNA samples were not available for analysis in patients 9–11; patient 12 (a boy) inherited an X chromosome deletion from his healthy mother, indicating a possible X-linked inheritance pattern. The five remaining CNVs were classified as likely benign (patients 12–17;

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	257
----------------	-------------------------	--------------------------------------	-------	-----

Table 2 Description and functional characterization summary of CNVs categorized as pathogenic (P) or probably pathogenic (PP).

	Gain/loss	Inheritance	Locus	Genomic position ^a	Size (Mb)	No. of affected genes	DECIPHER ^b	Mouse genome database ^c	Deletion syndrome	Main candidate genes ^d
P-CNV										
1	Loss	De novo	22q11.21	Chr22: 18,894,620-21,440,656	2.5	49	11	6	22q11.2	Contiguous gene syndrome
2	Gain	De novo	10q26.2-q26.3	Chr10: 129,100,719-130,723,355	1.6	6	1	2	—	—
3	Loss	De novo	10q26.3	Chr10: 130,811,542-135,404,671	4.5	34	11	2	10q26	GLRX3
PP-CNV										
4	Loss	De novo	4q28.2-q31.21	Chr4: 129,437,805-144,588,797	15.1	30	5	5	Interstitial 4q	GAB1
5	Loss	De novo	3q27.1-q27.3	Chr3: 183,902,785-187,476,327	3.5	46	4	9	—	IGF2BP2
6	Loss	De novo	20p13	Chr20: 82,892,481,772	0.4	13	1	1	—	CSNK2A1
7	Gain	De novo	14q11.2-q12	Chr14: 21,819,565-24,578,066	2.7	57	1	4	—	CHD8
8	Gain	De novo	16q24.1-q24	Chr16: 85,678,593-90,148,400	4.4	59	1	7	—	GALNS
	Gain	De novo	Xq13.1-q13.2	ChrX: 71,553,894-73,461,083	1.9	14	—	3	—	MIR421

^aGenomic positions are given according to Human Genome Building GCRh37, HG19.^bNumber of patients reported in the DECIPHER database with overlapping CNVs and prenatal-onset short stature.^cNumber of genes involved in growth impairment in mouse model.^dMain candidate genes involved in growth impairment of prenatal onset.

Supplementary Table 2), primarily because they did not segregate with phenotype. Four of them were absent in parents who shared a growth phenotype, while three of them were inherited from a healthy parent.

On comparing the copy number segments, the mean size of pathogenic and probably pathogenic variants was found to be 4.0 Mb, greater than the mean size of VUS and benign variants (0.66 Mb; $P=0.034$). Similarly, the mean gene content of pathogenic and probably pathogenic variants (38 genes) was richer than the mean gene content of VUS and benign variants taken together (1.8 genes; $P<0.001$).

Among the 51 patients, 27 were treated with recombinant human growth hormone (rhGH, mean dose of 50 µg/kg per day), and five of them were patients carrying pathogenic or probably pathogenic CNVs. Patients born SGA with pathogenic or probably pathogenic CNVs exhibited a first-year growth response to rhGH similar to that exhibited by patients born SGA without pathogenic CNVs (Supplementary Table 3, see section on supplementary data given at the end of this article).

Discussion

Modern research on CNVs in chromosomal segments has shown the importance of these variants as a significant source of human genetic variations accounting for disease, population diversity (29), and variation in stature in the general population (30). In the present study, we investigated 51 patients with prenatal-onset short stature associated with dysmorphic features and/or developmental delay, a condition of heterogeneous etiology. In eight of them (16%), rare pathogenic or probably pathogenic CNVs were detected, indicating that submicroscopic chromosomal losses and gains may be common in this population. This frequency is similar to the frequency of pathogenic CNVs found for other known conditions tested and diagnosed with genome-wide copy number analysis techniques, including developmental delay and congenital anomalies (5).

In a recent study, underlying pathogenic CNVs have been identified in 20 of 200 patients (10%) with short stature without an apparent cause; eight of these 20 patients were born SGA (13). In another study, genome-wide analysis of CNVs of 162 patients with short stature of unknown origin revealed at least 17 (10.4%) pathogenic variants, regarding familial segregation (12). The heterogeneous phenotypes observed in eight patients carrying pathogenic and probably pathogenic CNVs in the present study are quite common

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	258
----------------	-------------------------	--------------------------------------	-------	-----

Table 3 Clinical findings of the patients with CNVs categorized as pathogenic (P) or probably pathogenic (PP).

Patient	Gender	Age (years)	Height s.d.	Target height s.d.	GA (weeks)	Birth weight s.d.	Birth length s.d.	Clinical findings
P-CNV 1	F	5.8	-2.7	-1.5	39	-2.5	-1.4	Spina bifida without communication, clinodactyly of the fifth finger, and seizures
2	F	10.0	-3.7	-0.8	39	-2.3	-3.0	Microcephaly, cleft palate, deafness, squint, body asymmetry, pectus carinatum, triangular face, learning difficulties, and strabismus
3	M	5.7	-2.7	0.3	38	-2.3	-2.6	Microcephaly, developmental delay, and dysplastic ears
PP-CNV 4	F	4.8	-3.0	-0.1	38	-1.8	-2.9	Microcephaly, developmental delay, hyperactivity, and facial asymmetry
5	F	6.3	-2.9	-1.6	40	-2.1	-3.3	Epicanthus, short neck, marked lumbar lordosis, and muscular pseudohypertrophy
6	F	1.5	-2.6	-1.3	38	-2.0	-3.8	Microcephaly
7	F	19.0	-2.5	-0.1	39	-1.7	-3.5	Asplenia, corpus callosum dysgenesis, pulmonic stenosis, atrial septal defect, developmental delay, and scoliosis
8	M	12.4	-3.3	-0.4	31	-2.1	-3.6	Microcephaly, strabismus, developmental delay, ventricular septal defect, renal agenesis, cryptorchidism, body asymmetry, and vertebral fusion

GA, gestational age.

among syndromic individuals carrying chromosomal aberrations (29). Our results draw attention to the fact that pathogenic and probably pathogenic variants detected occurred in different chromosomal regions, which could explain the clinical variability of the SGA patients investigated in the present study. The same genetic variability was observed in the pathogenic and probably pathogenic CNVs in the two studies mentioned above (12, 13).

CNVs categorized as pathogenic or probably pathogenic in the present study fulfill some established deleterious criteria. All of them are *de novo*, are gene rich, are of significant size, and involve genes with functions in cell cycle, developmental process, and/or cell growth pathways (Supplementary Table 2) (5). Moreover, deletions found in three patients overlapped with known deletion syndromes. Therefore, aCGH allowed clinical genetic diagnosis and elucidation of the genetic basis of prenatal-onset short stature in eight patients carrying pathogenic or probably pathogenic CNVs in the present study, not suspected before copy number segment analysis.

The 22q11.21 deletion found in patient 1 overlapped with the genomic coordinates of the 22q11.2 deletion syndrome (or DiGeorge syndrome; OMIM #188400). This is one of the most common genomic alterations in humans, with an estimated frequency of 1:2000–1:4000 live births and a markedly variable phenotypic expression, leading to difficult diagnosis based on clinical grounds (26). Short stature during childhood has been described in

several clinical series, with frequencies ranging from 10 to 60% and ~26% of these short children being born SGA (31). Among the 49 coding genes deleted in patient 1, 24 have functions in cell cycle, developmental process, and/or cell growth pathways. However, no specific gene included in this deletion was found to be associated with the short stature phenotype. Nevertheless, it is worth pointing out that 22q11.2 deletion was the only pathogenic CNV identified in common in the present study as well as in other recent studies of CNVs in patients with short stature of unknown origin (14, 15).

The terminal 10q26.3 deletion found in patient 2 overlapped with the genomic coordinates of the 10q26 deletion syndrome (OMIM #609625). This is a rare contiguous gene deletion syndrome with more than 15 cases being reported (27). They all share distinct clinical features also found in our patient, mainly short stature of prenatal onset, microcephaly, deafness, strabismus, body asymmetry, and learning difficulties. Analysis of this variant revealed glutaredoxin 3 (*GLRX3*, OMIM #612754) to be the main candidate gene involved in the growth impairment of prenatal onset. This gene encodes an oxidoreductase enzyme (member of the glutaredoxin family), which plays a role in cellular growth and may inhibit apoptosis (32). *Glrx3*-knockout mice have been found to exhibit morphological defects with growth impairment (33).

The interstitial 4q28.2–31.2 deletion found in patient 3 overlapped with the 4q deletion syndrome, a rare

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	259
----------------	-------------------------	--------------------------------------	-------	-----

chromosomal disorder with an estimated incidence of 1:100 000 and nearly 150 cases being reported in the literature. Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4 have been reported with several clinical conditions affecting multiple organs and systems (28). Pre- or postnatal-onset short stature has been reported in ~50% of the cases, but the critical region responsible for growth impairment remains unclear. Nevertheless, in our analysis, we identified the growth factor receptor-bound protein 2-associated binding protein 1 (*GAB1*, OMIM #604439) to be the main candidate gene. The protein encoded by this gene plays a role in a broad range of growth factor and cytokine signaling pathways, including the insulin receptor signaling pathway (34). *GAB1* and 22 other coding genes included in the deletion found in patient three are part of the Stature Quantitative Trait Locus 12 (STQTL12, OMIM #612224), a region mapped as underlying an association with height trait based on the measurement of gene expression (35).

In functional characterization of the 3.5 Mb deletion found in patient 4, we identified IGF2 mRNA-binding protein 2 (*IGF2BP2*, OMIM #608289) to be the most promising gene with a putative role in the genetic control of growth. This gene was also deleted in four other patients reported in the DECIPHER with prenatal-onset short stature and CNVs overlapping the deletion of our patient (subject identification: 1495, 256 994, 257 537, and 257 773). *IGF2BP2* is a mRNA-binding protein involved in *IGF2* RNA localization, stability, and translation, being necessary for embryonic growth and development (36). Recently, the genome-wide association study Genetic Investigation of Anthropocentric Traits Consortium (GIANT) has identified the *IGF2BP2* locus to affect human height (rs720390) (37).

In bioinformatics analysis of the 20p13 deletion found in patient 5, we identified casein kinase II alpha 1 subunit isoform b (*CSNK2A1*, OMIM #115440) as the main candidate gene to be involved in the growth phenotype. This gene encodes the catalytic subunit of a serine/threonine protein kinase that phosphorylates acidic proteins, regulating cellular processes, such as cell cycle progression, apoptosis, and transcription (38). *Csnk2a1*-knockout mice have defects in limb development with growth impairment (39).

The remaining variants classified as probably pathogenic in the present study (patients 6–8) are copy number gains. Until recently, the interpretation of this type of CNV was considered a challenge in the literature. However, current studies and guidelines indicate its clinical relevance (40). In bioinformatics analysis of the

duplication found in patient 6, we identified 14 genes with functions in cell cycle, developmental process, and/or cell growth pathways. Among them, the most promising gene to be involved in growth impairment appeared to be chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (*CHD8*, OMIM #610528). This gene encodes a DNA helicase with functions in transcription repression by remodeling chromatin structure. It binds to β -catenin and negatively regulates the Wnt signaling pathway, which plays a role in early development and morphogenesis (41).

In the analysis of the 4.4 Mb duplication found in patient 7, we identified three genes with loci that have recently been characterized as affecting human height by genome-wide association studies: galactosamine-6-sulfate sulfatase (*GALNS*, OMIM #612222, rs8052560) (37), cytosolic thioluridylylase subunit 2 homolog (*CTU2*, rs8052560) (37), and spermatogenesis-associated 33 (*SPATA33*, rs154663) (42). *GALNS* encodes a lysosomal enzyme involved in the catabolism of keratan and chondroitin sulfate, the deficiency of which leads to mucopolysaccharidosis type IVA (43). *CTU2* and *SPATA33* encode proteins without a known function yet. In addition to establishing a causal genotype-phenotype correlation in our functional characterization, we found that the genomic region duplicated in patient seven is part of the STQTL22 (OMIM #613547).

The Xq13.1–13.2 duplication found in patient 8 is a rare condition and partially overlaps with duplications found in 12 other male patients reported in the literature (44). All these patients have been described to have growth impairment. In our bioinformatics analysis, we identified microRNA 421 (*MIR421*) as the main candidate gene to be involved in the growth phenotype. Recently, it has been shown that miR-421 levels are inversely correlated with that of mothers against DPP homolog 4 gene (*SMAD4*, OMIM #600993), functioning as a negative regulator of the expression of this target gene (45). *SMAD4* encodes a protein with an essential role in the signal transduction of the bone morphogenetic pathway (BMP) and the transforming growth factor (TGF) β pathway. Also recently, heterozygous missense *SMAD4* mutations have been described as the causative agents of Myhre syndrome (OMIM #139210) in patients fulfilling diagnostic criteria for the syndrome (46). Myhre syndrome is a rare developmental disorder, and interestingly its phenotype resembles some important clinical findings of patient 8 in the present study: prenatal-onset short stature, microcephaly, facial dysmorphisms, skeletal anomalies, developmental delay, congenital heart defects, and cryptorchidism. Thus, we hypothesize that the

duplication found in patient 8 could have been a gain-of-function effect of *MIR421*, which could have enhanced its negative regulation of *SMAD4* expression, leading to a clinical picture quite similar to that of Myhre syndrome.

It is important to note that the CNVs considered as pathogenic or probably pathogenic in the present study probably represent an underestimate: CNVs present in patients and inherited from a clinically normal parent may still contribute to the abnormal phenotype. There are several well-documented cases in the literature, including the 1q21 deletions associated with TAR syndrome (47) or the 16p12 deletions associated with autism (48) and Mullerian aplasia (49). Additionally, it is important to be aware that the aCGH technique does not detect uniparental disomy, a known cause for children being born SGA (14).

In conclusion, in the present study, we found CNVs in distinct chromosomal regions with several candidate genes that may be involved in the mechanisms of growth regulation and/or in the regulatory pathways of intra-uterine development. It is important to note that these candidate genes identified are hypotheses based on bioinformatics analyses and that further studies are necessary to clarify their involvement in growth pathways. Moreover, we found at least 16% pathogenic or probably pathogenic CNVs in a group of SGA patients with persistent short stature associated with dysmorphic features and/or developmental delay, indicating that rare CNVs are probably among the genetic causes of this condition. Our results improve the evidence of the importance of genome-wide copy number analysis as a clinical genetic test to clarify diagnoses in patients with growth impairment.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-14-0232>.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by grants 2013/03236-5 (to A A L Jorge) and 2009/00898-1 (to C Rosenberg) from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) and grants 307922/2013-8 (to J J P Arnhold), 473285/2011-8, and 304678/2012-0 (to A A L Jorge) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC & Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24–October 1, 2001. *Pediatrics* 2003 **111**: 1253–1261. (doi:10.1542/peds.111.6.1253)
- Wit JM, Kiess W & Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011 **25**: 1–17. (doi:10.1016/j.beem.2010.06.007)
- Renes JS, Willemsen RH, Wagner A, Finken MJ & Hokken-Koelega AC. Bloom syndrome in short children born small for gestational age: a challenging diagnosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98**: 3932–3938. (doi:10.1210/jc.2013-2491)
- Lee C, Lafrate AJ & Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature Genetics* 2007 **39**: S48–S54. (doi:10.1038/ng2092)
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics* 2010 **86**: 749–764. (doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006)
- Aboua A, Dupas C, Tachdjian G, Portnoi MF, Bourcigaux N, Dewailly D, Frydman R, Fauser B, Ronci-Chaix N, Donadille B *et al.* Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94**: 4540–4546. (doi:10.1210/jc.2009-0186)
- Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Putmann C, Blaszczak K, Saeed S, Hamilton-Shield J, Clayton-Smith J, O'Rahilly S *et al.* Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature* 2010 **463**: 666–670. (doi:10.1038/nature08689)
- Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers HH, Grueters A, Krude H & Ullmann R. Screening chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization in 80 patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95**: 3446–3452. (doi:10.1210/jc.2009-2195)
- Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, Kuechler A & Wieacker P. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Human Reproduction* 2010 **25**: 2637–2646. (doi:10.1093/humrep/deq167)
- de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Genevieve D, Goldenberg A, Oufadem M *et al.* Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nature Genetics* 2011 **43**: 1026–1030. (doi:10.1038/ng.915)
- Spengler S, Begemann M, Ortiz Bruchle N, Baudis M, Denecke B, Kroisel PM, Oehl-Jaschkowitz B, Schulze B, Raabe-Meyer G, Spaich C *et al.* Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with Silver–Russell features. *Journal of Pediatrics* 2012 **161**: 933–942. (doi:10.1016/j.jpeds.2012.04.045)
- van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, Oostdijk W, Gijsbers AC, Hoffer MJ, Karperien M, Walenkamp MJ, Noordam C, Voorhoeve PG *et al.* Copy number variants in patients with short stature. *European Journal of Human Genetics* 2014 **22**: 602–609. (doi:10.1038/ejhg.2013.203)
- Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, Hoyer J, Wiesener A, Wiczorek D, Kunstmann E, Reis A, Doerr HG, Rauch A *et al.* Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genetics* 2013 **9**: e1003365. (doi:10.1371/journal.pgen.1003365)
- Dias RP, Nightingale P, Hardy C, Kirby G, Tee L, Price S, Macdonald F, Barrett TG & Maher ER. Comparison of the clinical scoring systems in Silver–Russell syndrome and development of modified diagnostic

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	261
criteria to guide molecular genetic testing. <i>Journal of Medical Genetics</i> 2013 50 635–639. (doi:10.1136/jmedgenet-2013-101693)				
15 Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, Mendonça BB, Arnhold IJ & Jorge AA. Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. <i>Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism</i> 2007 92 4889–4892. (doi:10.1210/jc.2007-1661)				
16 Leal AC, Montenegro LR, Saito RF, Ribeiro TC, Coutinho DC, Mendonça BB, Arnhold IJ & Jorge AA. 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). <i>Clinical Endocrinology</i> 2012 78 558–563. (doi:10.1111/cen.12048)				
17 Allemesch J, Van Vooren S, Hannes F, De Moor B, Vermeesch JR & Moreau Y. An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. <i>BMC Bioinformatics</i> 2009 10 380. (doi:10.1186/1471-2105-10-380)				
18 Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW & Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. <i>Nature Genetics</i> 2004 36 949–951. (doi:10.1038/ng1416)				
19 Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corvas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM & Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. <i>American Journal of Human Genetics</i> 2009 84 524–533. (doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.010)				
20 Moreau Y & Tranchesi LC. Computational tools for prioritizing candidate genes: boosting disease gene discovery. <i>Nature Reviews. Genetics</i> 2012 13 523–536. (doi:10.1038/nrg3253)				
21 Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM & Haussler D. The human genome browser at UCSC. <i>Genome Research</i> 2002 12 996–1006. (doi:10.1101/gr.229102)				
22 Kozomara A & Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. <i>Nucleic Acids Research</i> 2011 39 D152–D157. (doi:10.1093/nar/gkq1027)				
23 Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM <i>et al.</i> miTarBase: a database curates experimentally validated microRNA–target interactions. <i>Nucleic Acids Research</i> 2010 39 D163–D169. (doi:10.1093/nar/gkq1107)				
24 Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA & Richardson JE. The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. <i>Nucleic Acids Research</i> 2012 40 D881–D886. (doi:10.1093/nar/gkr974)				
25 Seelow D, Schwarz JM & Schuelke M. GeneDistiller – distilling candidate genes from linkage intervals. <i>PLoS ONE</i> 2008 3 e3874. (doi:10.1371/journal.pone.0003874)				
26 Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. <i>Developmental Disabilities Research Reviews</i> 2008 14 3–10. (doi:10.1002/ddr.2)				
27 Yatsenko SA, Krueger MC, Bader PJ, Corzo D, Schuette J, Keegan CE, Nowakowska B, Peacock S, Cai WW, Pfeiffer DA <i>et al.</i> Identification of critical regions for clinical features of distal 10q deletion syndrome. <i>Clinical Genetics</i> 2009 76 54–62. (doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01115.x)				
28 Strehle EM, Yu L, Rosenfeld JA, Donkersvoort S, Zhou Y, Chen TJ, Martinez JE, Fan YS, Barbouth D, Zhu H <i>et al.</i> Genotype–phenotype analysis of 4q deletion syndrome: proposal of a critical region. <i>American Journal of Medical Genetics. Part A</i> 2012 158A 2139–2151. (doi:10.1002/ajmg.a.35502)				
29 Girirajan S, Campbell CD & Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. <i>Annual Review of Genetics</i> 2011 45 203–226. (doi:10.1146/annurev-genet-102209-163544)				
30 Dauber A, Yu Y, Turchin MC, Chiang CW, Meng YA, Demerath EW, Patel SR, Rich SS, Rotter JI, Schreiner PJ <i>et al.</i> Genome-wide association of copy-number variation reveals an association between short stature and the presence of low-frequency genomic deletions. <i>American Journal of Human Genetics</i> 2011 89 751–759. (doi:10.1016/j.ajhg.2011.10.014)				
31 Guzman ML, Delgado I, Lay-Son G, Willans E, Puga A & Repetto GM. Growth in Chilean infants with chromosome 22q11 microdeletion syndrome. <i>American Journal of Medical Genetics. Part A</i> 2012 158A 2682–2686. (doi:10.1002/ajmg.a.35525)				
32 Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N & Altman A. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- κ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2000 275 1902–1909. (doi:10.1074/jbc.275.3.1902)				
33 Cheng NH, Zhang W, Chen WQ, Jin J, Cui X, Butte NF, Chan L & Hirschi KD. A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis. <i>FEBS Journal</i> 2011 278 2525–2539. (doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08178.x)				
34 Itoh M, Yoshida Y, Nishida K, Narimatsu M, Hibi M & Hirano T. Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 2000 20 3695–3704. (doi:10.1128/MCB.20.10.3695-3704.2000)				
35 Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M & Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. <i>Nature Reviews. Genetics</i> 2009 10 184–194. (doi:10.1038/nrg2537)				
36 Christiansen J, Kolte AM, Hansen T & Nielsen FC. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. <i>Journal of Molecular Endocrinology</i> 2009 43 187–195. (doi:10.1677/JME-09-0016)				
37 Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, Willer CJ, Jackson AU, Vedantam S, Raychaudhuri S <i>et al.</i> Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. <i>Nature</i> 2010 467 832–838. (doi:10.1038/nature09410)				
38 Lolli G, Pinna LA & Battistutta R. Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. <i>ACS Chemical Biology</i> 2012 7 1158–1163. (doi:10.1021/cb300054n)				
39 Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C & Seldin DC. The α catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 2008 28 131–139. (doi:10.1128/MCB.01119-07)				
40 Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-Knol HE, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH <i>et al.</i> Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. <i>European Journal of Human Genetics</i> 2012 20 161–165. (doi:10.1038/ejhg.2011.174)				
41 Nishiyama M, Skoultschi AI & Nakayama KI. Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt- β -catenin signaling pathway. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 2012 32 501–512. (doi:10.1128/MCB.06409-11)				
42 Hao Y, Liu X, Lu X, Yang X, Wang L, Chen S, Li H, Li J, Cao J, Chen J <i>et al.</i> Genome-wide association study in Han Chinese identifies three novel loci for human height. <i>Human Genetics</i> 2013 132 681–689. (doi:10.1007/s00439-013-1280-9)				
43 Hendriks CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, Gravance CG, Orii T & Tomatsu S. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. <i>Molecular Genetics and Metabolism</i> 2013 110 54–64. (doi:10.1016/j.ymgme.2013.04.002)				
44 Lugtenberg D, de Brouwer AP, Oudakker AR, Pfundt R, Hamel BC, van Bokhoven H & Bongers EM. Xq13.2q21.1 duplication encompassing the ATRX gene in a man with mental retardation, minor facial and genital anomalies, short stature and broad thorax. <i>American Journal of Medical Genetics. Part A</i> 2009 149A 760–766. (doi:10.1002/ajmg.a.32742)				
45 Hao J, Zhang S, Zhou Y, Liu C, Hu X & Shao C. MicroRNA 421 suppresses DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. <i>Biochemical and</i>				

Clinical Study	A P M Canton and others	Copy number variants in SGA children	171:2	262
----------------	-------------------------	--------------------------------------	-------	-----

- Biophysical Research Communications* 2011 **406** 552–557. (doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.086)
- 46 Le Goff C, Mahaut C, Abhyankar A, Le Goff W, Serre V, Atenjar A, Destree A, di Rocco M, Heron D, Jacquemont S *et al.* Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nature Genetics* 2011 **44** 85–88. (doi:10.1038/ng.1016)
- 47 Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM *et al.* Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *American Journal of Human Genetics* 2007 **80** 232–240. (doi:10.1086/510919)
- 48 Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH Jr, Dobyns WB *et al.* Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics* 2008 **17** 628–638. (doi:10.1093/hmg/ddm376)
- 49 Sandbacka M, Laiivuori H, Freitas E, Halttunen M, Jokimaa V, Morin-Papunen L, Rosenberg C & Aittomaki K. TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Mullerian aplasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013 **8** 125. (doi:10.1186/1750-1172-8-125)

Received 20 March 2014
Revised version received 28 May 2014
Accepted 30 May 2014