ROBERTA LELIS DUTRA

Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2014

ROBERTA LELIS DUTRA

Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dutra, Roberta Lelis

Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) / Roberta Lelis Dutra. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Pediatria.

Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Variações do número de cópias de DNA 2.Técnicas de diagnóstico molecular 3.Reação em cadeia da polimerase multiplex 4.Anomalias congênitas 5.Deficiência intelectual

USP/FM/DBD-184/14

Dedicatória

*A todos os pacientes e seus familiares,
pela inestimável contribuição para
a construção deste trabalho.*

Agradecimientos

Ao meu marido e companheiro Thiago pelo incentivo nos momentos bons e principalmente nos mais difíceis. Agradeço imensamente todo o apoio e o amor que dedicaste a mim em todos esses anos.

Aos meus pais Carlos e Luzia pelo amor incondicional e à minha irmã Camila por todos os momentos de alegria e amizade. Meus amores, obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e na minha carreira.

A todos os meus amigos do Laboratório de Citogenômica pelos momentos especiais que passei durante a execução deste trabalho. Agradeço por cada minuto junto a este grupo que tive a honra de trabalhar quatro anos e que mesmo estando longe por alguns meses, fez eu me sentir muito próxima. Com certeza são exemplos de companheirismo, dedicação, amor ao trabalho e perseverança que mantém este grupo ainda mais unido.

Continuo os meus sinceros agradecimentos às minhas queridas orientadoras **Profa. Dra. Chong Ae Kim** e **Dra. Leslie Domenici Kulikowski**. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda e amizade neste período da minha vida. Obrigada pela confiança que depositaram em mim e pelo companheirismo na vida académica e pessoal.

Aos meus grandes amigos e profissionais **Alexandre Dias, Amom Nascimento, Évelin Zanardo, Flavia Piazzon, Gil Monteiro Novo Filho, Marília Montenegro** e **Thaís Moura** por me acompanharem nesta jornada, principalmente na finalização do projeto. Obrigada pela dedicação e a amizade que sempre levarei comigo.

Aos alunos e estagiários do Laboratório de Citogenômica, **Camila, Fábio, Mariana, Natália, Andreza, Agnes, Mayra, Fabrícia** e **Fernanda** por todo auxílio na preparação da tese.

À querida orientadora, **Profa. Dra. Joana Barbosa de Melo** e à **Profa. Dra. Isabel Carrera** pela oportunidade em desenvolver uma parte da tese no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Portugal e por me receberem com grande carinho.

Aos queridos **Susana Ferreira, Miguel Pires** e **José Ferrão** do Laboratório de Citogenética e Genómica – Coimbra por todo o auxílio nos experimentos realizados durante o período de estágio no exterior, análise dos resultados e principalmente pela amizade.

À todos os **pesquisadores** e **funcionários** do Laboratório de Citogenética e Genómica – Coimbra: **Nuno, Ilda, Patrícia, Cláudia, Lúcia, Alexandra, Marta, Ana Jardim e Carla** pela atenção em todo o período que estive no laboratório e pelos ensinamentos durante o estágio em Coimbra. Cada um contribuiu de forma especial para o meu crescimento pessoal e académico.

Aos grandes amigos que conheci durante o estágio em Portugal, **Maria Lopes de Almeida, João Santos, Mariana Alves, Ana Cainço e Sérgio Portovedo**, por terem feito dos meus dias em Coimbra um período inesquecível para mim.

Aos médicos da Unidade de Genética do Instituto da Criança **Dra. Rachel Honjo e Dra. Débora Bertola**, e aos residentes **Caio, Ellaine, Guilherme, Larissa, Stephanie e Tatiana** pelo auxílio no atendimento aos pacientes e seus familiares, além do aprendizado clínico transmitido pela equipe.

À **Marcília Grassi** pela dedicação aos pacientes e pelo auxílio com descrição clínica.

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

Ao Prof. **Dr. Alberto Duarte** e ao **departamento de Patologia da FMUSP** pela colaboração durante execução das técnicas moleculares.

Ao **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba-SP, e ao **Ricardo Brassaloti e Gustavo Gasparin** pela imensa ajuda na execução na técnica de array e por me receberem sempre com dedicação.

À toda a equipe **do Laboratório de Genética da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP**, pela colaboração durante os anos de desenvolvimento da tese.

Às queridas **Fernanda e Carol** pelo carinho e amizade que se iniciou ainda no mestrado, sempre com companheirismo, auxiliando na preparação das técnicas moleculares.

Ao pesquisador **Daniel Silvestre** pelo auxílio com as análises de bioinformática e na elaboração dos gráficos presentes na tese.

Ao **Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor)**, principalmente à **Raquel Alencar** pela amizade e disponibilidade de auxílio nas reações de eletroforese capilar.

Aos **funcionários e alunos do LIM 36** que de alguma forma colaboraram com este trabalho e que me apoiaram na conclusão deste projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro deste trabalho (bolsa regular e BEPE).

Enfim, **a todos** que de alguma maneira tornaram este trabalho possível e assim, contribuíram para a conclusão de mais uma etapa na minha formação acadêmica, além de colaborarem para o meu crescimento profissional e pessoal.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1. Variação no número de cópias – CNVs.....	32
1.2. Síndromes de microdeleções / microduplicações.....	35
1.2.1. Síndrome de deleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren).....	36
1.2.2. Síndrome de Smith-Magenis (deleção 17p11.2).....	38
1.2.3. Síndrome de microduplicação alélica em 17p11.2.....	39
1.2.4. Síndrome de Alagille (deleção 20p11.2).....	40
1.2.5. Síndrome de Prader-Willi e Angelman (deleção 15q11-q13).....	40
1.2.6. Síndrome de deleção em 22q11.2.....	43
1.2.7. Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p-).....	44
1.2.8. Síndrome de Cri-du-chat (5p-).....	46
1.3. Alterações subteloméricas e fenótipos clínicos.....	46
1.4. Análise molecular das CNVs.....	48
1.4.1. Triagem molecular por MLPA.....	48
1.4.2. Triagem molecular por oligoarrays.....	50
2. OBJETIVOS.....	53
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
3.1. Casuística.....	55
3.2. Métodos.....	56
3.2.1. Extração de DNA genômico.....	56

3.2.2. Reações de MLPA.....	57
3.2.2.1. Preparação das amostras para eletroforese capilar.....	58
3.2.2.2. Análise dos resultados de MLPA.....	59
3.2.3. Triagem genômica comparativa por oligoarrays.....	60
3.2.3.1. CGH-array – plataforma Agilent.....	61
3.2.3.2. SNP array – plataforma Illumina.....	62
3.2.3.3. Análise de bioinformática.....	62
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Principais síndromes de microdeleções encontradas pelo kit P064.....	67
4.2. Síndrome de deleção 22q11 (DiGeorge / Velocardiofacial).....	68
4.3. Síndrome de deleção 7q11.2 (Williams-Beuren).....	70
4.4. Microduplicação na região 7q11.2.....	72
4.5. Alterações encontradas pelo kit específico P250.....	73
4.6. Regiões subteloméricas (kits P036 e P070).....	74
4.7. Tipos de alterações encontradas pelos kits P036 e P070.....	75
4.8. Alterações encontradas pelos kits P064, P036 e P070 em conjunto.....	82
4.9. Duplicação da região 5q35.3.....	84
4.10. Duplicação atípica 22q11.2.....	88
4.11. Deleção atípica da síndrome de Williams-Beuren.....	89
4.12. Síndrome de deleção 1p36.....	90
5. DISCUSSÃO.....	94
5.1. Investigação de CNVs <i>de novo</i> e herdadas.....	95
5.2. Investigação das principais síndromes de microdeleções.....	98
5.3. Síndrome de deleção 22q11 (DiGeorge / Velocardiofacial).....	99
5.4. Síndrome de deleção 7q11.2 (Williams-Beuren).....	100
5.5. Microduplicação na região 7q11.2.....	100
5.6. Detecção de outras alterações genômicas utilizando o kit P250.....	101
5.7. Investigação das alterações subteloméricas (kits P036 e P070).....	102
5.8. Tipos de alterações genômicas encontradas pelos kits P036 e P070.....	104

5.9. Alterações encontradas pelos kits P064, P036 e P070 em conjunto.....	106
5.10. Rearranjos complexos.....	107
5.11. Considerações sobre a técnica de oligoarray.....	109
6. CONCLUSÕES.....	112
7. ANEXOS.....	114
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (genitores).....	114
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (paciente).....	118
Anexo C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP.....	122
Anexo D – Tabela das sondas disponíveis nos kits da MLPA.....	123
Anexo E – Artigo aceito para publicação: <i>Molecular Genetics and Genomics</i>	129
Anexo F – Artigo submetido: <i>Arquivos Brasileiros de Cardiologia</i>	138
Anexo G – Artigo submetido: <i>Orphanet Journal of Rare Disease</i>	150
8. REFERÊNCIAS.....	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do mecanismo de recombinação homóloga não alélica.....	33
Figura 2 – Representação de alterações não recorrentes.....	34
Figura 3 – Representação da região 7q11.23.....	37
Figura 4 – Representação da região 17p11.2.....	39
Figura 5 – Representação das alterações na região 15q11.3.....	42
Figura 6 – Representação da região 22q11.2.....	44
Figura 7 – Etapas da técnica de MLPA.....	49
Figura 8 – Imagem representativa das regiões no genoma com a localização das sondas de MLPA.....	66
Figura 9 – Gráfico das alterações encontradas pela MLPA.....	67
Figura 10 – Resultado das deleções atípicas da região 22q11.2.....	70
Figura 11 – Resultado da deleção para a região 7q11.23 pela MLPA.....	71
Figura 12 – Resultado da duplicação para a região 7q11.23 pela MLPA.....	73
Figura 13 – Resultado deletado e duplicado da MLPA.....	76
Figura 14 – Resultado deletado e duplicado da MLPA.....	78
Figura 15 – Resultado deletado e duplicado da MLPA.....	79
Figura 16 – Resultado do CGH-array.....	80
Figura 17 – Resultado do CGH-array.....	81
Figura 18 – Imagem representativa das alterações encontradas.....	83
Figura 19 – Resultado da MLPA.....	85
Figura 20 – Resultado do SNP-array.....	86
Figura 21 – Resultado do CGH-array.....	87
Figura 22 – Resultado do oligoarray e MLPA.....	90
Figura 23 – Resultado do SNP-array e MLPA.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações encontradas pelo kit P064 da técnica de MLPA.....	68
Tabela 2 – Alterações encontradas pelos kits P036 e P070 da técnica de MLPA.....	74
Tabela 3 – Alterações encontradas em um dos kits P036 ou P070.....	75
Tabela 4 – Rearranjos encontrados com os kits P064, P036 e P070 da MLPA.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros de corrida para o equipamento de eletroforese capilar.....	59
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AC	Anomalias congênitas
ADNPM	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor
array-CGH	Hibridação genômica comparativa (do inglês <i>Array-based comparative genomic hybridization</i>)
cm	Centímetros
CNV	Variação de número de cópias (do inglês <i>Copy Number Variation</i>)
DGV	Banco de dados de variantes genômicas - <i>Database Genomic Variants</i>
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i>)
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
EASV	Estenose aórtica supralvalvar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (do inglês <i>Fluorecent in situ Hybridization</i>)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FoSTeS	Atraso da forquilha de replicação e mudança de molde de DNA (do inglês <i>fork stalling and template switching</i>)
HC	Hospital das Clínicas
HR	Recombinação Homóloga (do inglês <i>Homologue Recombination</i>)
ICr	Instituto da Criança
kb	Quilobase
KHCO ₃	Carbonato de potássio
LCR	Regiões de baixa repetição (do inglês <i>Low Copy Repeats</i>)
LIM	Laboratório de Investigação em Pediatria Clínica
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

ml	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mM	Milimolar
MMBIR	Replicação induzida pela quebra de DNA por homologia (do inglês <i>microhomology-mediated break induced replication</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NAHR	Recombinação homóloga não alélica (do inglês <i>Non Allelic Homologous Recombination</i>)
ng	Nanograma
ng/μl	Nanograma por microlitro
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês <i>Next Generation Sequence</i>)
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NHEJ	União terminal não homóloga (do inglês <i>Non-homologous end joining</i>)
°C	Graus Celsius
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)

Dutra, RL. *Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Os desequilíbrios genômicos constituem causa frequente de abortamento, anomalias congênitas (AC) e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM). No entanto, a etiologia desses desequilíbrios ainda não é completamente conhecida, o que dificulta o aconselhamento e a conduta de tratamento na maioria dos casos. No cenário atual, diversos pacientes com essas alterações ficam sem diagnóstico conclusivo, uma vez que esses testes ainda não estão completamente disponíveis. De fato, o aprimoramento de novas técnicas de diagnóstico citogenômico, como por exemplo, a MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e a triagem ampla do DNA utilizando *arrays*, mostraram que a alteração no número normal de cópias genômicas (CNVs) influencia na patogenicidade dos fenótipos em diversas síndromes. **OBJETIVOS:** Com isso, os objetivos do presente estudo foram identificar CNVs em pacientes com MC e ADNPM utilizando a técnica de MLPA e, a partir dos resultados alterados, aplicar da técnica de *array* para a identificação de possíveis rearranjos complexos, além de associar as alterações moleculares encontradas com o fenótipo dos pacientes. **MÉTODOS:** Participaram do estudo 416 pacientes com MC e ADNPM. As amostras de DNA foram analisadas utilizando a técnica de MLPA com kits comerciais para as principais síndromes de microdeleções (P064) e regiões subteloméricas (P036 e P070). Dois kits de MLPA específicos para as regiões 7q11.23 (P029) e 22q11.2 (P250) também foram utilizados para complementar a identificação de CNVs atípicas. Entre os casos que apresentavam alterações pela técnica de MLPA, 15 pacientes foram submetidos à técnica de *array*, utilizando três diferentes plataformas: Agilent SurePrint G3 Genoma Humano microarray 180 K, HumanCytoSNP-12 BeadChip, CytoScan™ HD array

6.0 Affymetrix®. **RESULTADOS:** A análise molecular pela técnica de MLPA possibilitou a detecção de microdeleções e/ou microduplicações em 97 pacientes sendo que: em 46 pacientes foi possível encontrar alterações utilizando apenas o kit P064 (microdeleções), em 34 pacientes utilizando apenas os kits P036 e P070 (regiões subteloméricas) e em quatro pacientes só foi possível identificar a alteração utilizando outro kit de MLPA (P250), específico para alterações genômicas em 22q11.2. Rearranjos complexos, envolvendo mais de três cromossomos, foram observados em 10 pacientes. **DISCUSSÃO:** A MLPA permitiu detectar CNVs em 97/416 pacientes (23,3%), sendo uma técnica ideal para ser aplicada em pacientes com sinais fenotípicos inespecíficos. Algumas alterações genômicas encontradas estão relacionadas também com alterações específicas, como a presença de malformação cardíaca ou convulsões. E em outros casos a alta variabilidade fenotípica pode ser associada a um conjunto de CNVs consideradas patogênicas. Além disso, a inclusão de outra técnica de triagem, com maior cobertura do genoma permitiu detectar rearranjos complexos antes não observados mesmo em síndromes bem descritas como as síndromes de microdeleções 7q11.23 e 22q11.2. **CONCLUSÃO:** A MLPA com kits combinados, por possuir maior abrangência de regiões detectadas e menor custo, é uma ferramenta valiosa para ser utilizada como um teste de triagem diagnóstica.

Descritores: Variações do número de cópias de DNA; Técnicas de diagnóstico molecular; Reação em cadeia da polimerase multiplex; Anomalias congênitas; Deficiência intelectual.

Dutra, RL. *Investigation of the copy number variation (CNVs) in patients with congenital anomalies (CA) and mental retardation (MR) using the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) technique*. [thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUCTION: Genomic imbalances are the most common cause of miscarriage, congenital anomalies (CA) and mental retardation (MR). However, the etiology of these imbalances is not well understood, what makes the genetic counseling and the follow-up difficult, in most cases. Currently, many patients with these abnormalities genomic may remain without conclusive diagnostic, since this molecular diagnostics tests are not completely available. In fact, with the improvement of new cytogenomics diagnostic techniques, such as the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) and the array techniques, it have been shown that changes in the normal gene copy number influence the pathogenic variability of phenotypes in different syndromes. **AIMS:** The aims of the present study were to identify CNVs in patients with CM and RM using the MLPA technique and, from the abnormalities results, to apply the array methodology for the identification of complex rearrangements. Furthermore, the study aimed to associate the alterations found by molecular techniques with the phenotype of patients. **METHODS:** 416 patients with CM and RM participated in the study. The samples were analysed by MLPA technique with commercial kits for the main microdeletion syndromes (P064) and subtelomeric regions (P036 and P070). Two more MLPA kits for specific regions 7q11.23 (P029) and 22q11.2 (P250) were used to confirm the altered results and to complement some results with the identification of atypical abnormalities. From the patients who presented abnormalities by MLPA technique, 15 underwent by microarray-based comparative genomic hybridization (CGH-array) technique, using three different platform: Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 kb, HumanCytoSNP -12 BeadChip, CytoScan™ HD ® and Affymetrix 6.0. **RESULTS:** The molecular analysis by MLPA technique allowed the detection of microdeletions and/or

microduplications in 97 patients. In 46 patients it was possible to find genomic alteration using only MLPA kit P064 and in 34 patients using only the subtelomeric kits P036 and P070. For four patients it was only possible to identify the genomic abnormalities using another specific MLPA kit (P250), involving the 22q11.2 region. Complex rearrangements involving more than three chromosomes were detected in 10 patients. **DISCUSSION:** The MLPA technique was capable of detecting CNVs in 97/416 (23,3%) of patients, being an ideal technique to be applied in patients with non-specific signs phenotypic. Some genomic alterations found are, also related to specific changes, such as the presence of cardiac malformation or convulsions. In other cases, the high phenotypic variability may be associated to certain group of pathogenic CNVs. Moreover, the inclusion of additional screening method, with greater coverage, allowed the detection of complex rearrangements not seen before even in syndromes as well described microdeletions syndromes on 7q11.23 and 22q11.2 regions. **CONCLUSION:** The MLPA technique can be a valuable tool used as a molecular screening test, because it has greater coverage and lower cost of detected regions.

Descriptors: DNA Copy Number Variations; Molecular Diagnostic Techniques; Multiplex Polymerase Chain Reaction; Congenital Abnormalities; Intellectual Disability.

1. INTRODUÇÃO

As alterações cromossômicas constituem uma das causas mais frequentes de malformações congênitas múltiplas (2 a 3% dos nascidos vivos), deficiências de crescimento, dificuldades de aprendizagem e deficiência cognitiva, compreendendo um grupo extenso e heterogêneo de doenças (Lupski, 1998; de Vries et al., 2005).

As doenças genômicas são frequentemente esporádicas, causadas pela variação no número de cópias gênicas (CNV - do inglês, *copy number variation*) (Stankiewicz e Lupski, 2002).

As CNVs são definidas como fragmentos de DNA maiores do que um quilobase (1 Kb) com um número variado de cópias no genoma (Freeman et al., 2006; Pinto et al., 2007). Essa alteração no número de cópias pode apresentar um potencial patogênico ou ser apenas uma variante de significado clínico incerto (VOUS do inglês, *variants of uncertain clinical significance*) (Miller et al., 2010; Lee et al., 2012).

De qualquer forma a identificação dessas alterações é cada vez mais relevante para o diagnóstico. Com o advento das técnicas citogenômicas, diversos trabalhos têm revelado que as microdeleções/microduplicações no genoma humano são as maiores causas de múltiplas anomalias congênitas e deficiência intelectual (de Ravel et al., 2006; Shoukier et al., 2013).

Nos últimos anos, tem se tornado evidente que as alterações na arquitetura cromossômica aumentam a susceptibilidade a rearranjos genômicos e consequentemente desencadeiam diversas doenças (Stankiewicz e Baudet, 2007). Com isso, a presença de um fenótipo clínico alterado poderá depender do gene ou região gênica envolvida no rearranjo genômico, resultando em efeitos de dosagem, interrupção gênica ou até mesmo influenciando em um alelo recessivo (Carvalho et al., 2009; Henrichsen et al., 2009).

1.1. Variação no número de cópias - CNVs

Com a chegada de ferramentas moleculares mais acuradas para a identificação do genoma, como a técnica de hibridação genômica comparativa por *array* (CGH-*array*), diferentes variações estruturais do DNA incluindo as deleções, duplicações e inserções, foram identificadas como um produto da diversidade fenotípica ao longo da evolução humana (Sebat, 2007; Dudley et al., 2012).

Nos últimos anos, as investigações sobre as variações no número de cópias genômicas tem se apresentado de grande importância na identificação da etiologia das doenças genômicas, além de fornecer informações sobre os mecanismos de formação das CNVs.

Considerando que esses rearranjos sejam formados por quebras e junções de determinados segmentos genômicos, as CNVs podem ser divididas em dois grandes grupos: as CNVs “recorrentes” e as “não recorrentes”, ambas mediadas por diferentes mecanismos na formação de rearranjos estruturais (Klopocki e Mundlos, 2011).

As CNVs “recorrentes”, compostas de quebras frequentemente localizadas em determinadas regiões, são descritas como alterações que possuem pontos de quebra entre sequências muito semelhantes, ou seja, são mediadas por sequências altamente repetitivas, conhecidas como LCRs (*low copy repeats*) (Figura 1). Essas sequências altamente similares (> 95%), com tamanho aproximado de 10 kb, geram uma ampla oportunidade para a ocorrência da recombinação homóloga não alélica (NAHR – *non-allelic homologous recombination*) (Lupski e Stankiewicz, 2005).

Figura 1 - Representação do mecanismo de recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre os blocos de sequências repetitivas, representadas em azul, um dos principais responsáveis à formação microdeleções e microduplicações. Adaptado de Eichler Lab <https://eichlerlab.gs.washington.edu/research.html>

Esse tipo de recombinação é considerado um dos principais mecanismos associados às doenças genômicas. A partir de estudos preditivos sobre a arquitetura genômica, aproximadamente 37 regiões do genoma tem sido associadas à doenças genômicas (Sharp et al., 2006; Liu et al., 2012).

Em outro grande grupo, estão presentes as CNVs consideradas “não recorrentes” (Figura 2), onde as sequências que flanqueiam os pontos de quebra possuem uma similaridade mais limitada, abrangendo apenas poucos pares de base (2 a 15 pb) (Lee et al., 2007; Hastings et al., 2009).

Figura 2 - Representação de alterações não recorrentes em vermelho. As CNVs não recorrentes podem apresentar alterações que afetam o mesmo gene (retângulo preto), considerada uma região de sobreposição ou pontos de quebra em regiões de LCRs (retângulo pontilhado). Adaptado de Gu et al., 2008

Essas CNVs são caracterizadas principalmente por ocorrer através do mecanismo de união terminal não homóloga (NHEJ do inglês *Non-homologous end joining*) e por apresentar rearranjos complexos, incluindo a presença de sequências de outras regiões inseridas na junção dos pontos de quebra, duplicações, triplicações, inversões e deleções, muitas vezes intercaladas por sequências com número normal de cópias (Gajecka et al., 2008).

Embora as CNVs “não recorrentes” não sejam frequentemente flanqueadas por sequências repetitivas, esses rearranjos podem ocorrer em regiões ricas em LCRs, e assim aparecerem no sentido invertido das sequências de DNA, alterando a arquitetura genômica (Stankiewicz et al., 2003).

Em decorrência do aprimoramento das técnicas de triagem do genoma diferentes tipos de CNVs, antes imperceptíveis, puderam ser detectadas e

relacionadas a fenótipos patogênicos, principalmente em síndromes de malformações.

1.2. Síndromes de microdeleções / microduplicações

A primeira correlação entre uma alteração cromossômica e uma síndrome de malformação congênita e DI foi realizada por Jerome Lejeune e colaboradores em 1959, quando identificaram a presença de um cromossomo adicional do grupo G em pacientes com Síndrome de Down (Schaaf et al., 2011). Assim, a compreensão da etiologia dessas alterações se tornou fundamental para o tratamento desses pacientes e o aconselhamento genético familiar.

As síndromes de microdeleções e microduplicações foram observadas inicialmente com o surgimento das técnicas moleculares, como a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) que permitiram a identificação de rearranjos menores, antes não visualizados por bandamento G (Krantz e Spinner, 2007).

Essas alterações no número de cópias são frequentemente caracterizadas por um conjunto de fenótipos, que apresentam variação estrutural de dois ou mais genes próximos, também chamadas de “síndrome de genes contíguos” (Slavotinek et al., 2008). Essas patologias foram inicialmente descritas a partir da identificação de alterações estruturais em pacientes que compartilhavam o mesmo fenótipo clínico, levando assim à descoberta de regiões críticas para cada síndrome (Shaffer et al., 2007).

1.2.1. Síndrome de deleção de 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)

A Síndrome de Williams-Beuren (SWB, #194050) se caracteriza por microdeleções em homozigose de genes contíguos na região 7q11.23. A prevalência da SWB é de 1:7.500 a 1:20.000 nascidos-vivos (Strømme et al., 2002), ocasionada principalmente por deleções *de novo* e em raros casos familiares apresenta um padrão de herança autossômica dominante (Morris et al., 1993).

As características clínicas incluem fácies típica (fronte alargada, ponte nasal baixa, nariz curto e arrebitado, filtro nasal longo, bochechas proeminentes, lábios grossos), alterações cardíacas (estenose aórtica supraválvula) e oculares, hiperacusia, DI, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, déficit cognitivo e hipersociabilidade (Pober, 2010).

A região crítica para a SWB (7q11.23) apresenta mais de 28 genes, incluindo o gene da elastina (*ELN*), e é constituída por uma sequência gênica de cópia única com tamanho aproximado de 1,2 Mb e por três grandes blocos de DNA ou sequências de LCR (*low copy repeats*) denominadas como blocos "A", "B" e "C".

O resultado da recombinação entre os blocos de LCRs gera uma deleção de 1,55 Mb e corresponde a aproximadamente 90% dos casos com SWB e outra deleção menos frequente, de 1,84 Mb (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da região 7q11.23, causadora da SWB, mostrando os principais tamanhos das deleções nesta região. As LCRs (A, B e C) estão representadas pelas setas coloridas verde, azul e vermelho, respectivamente (c, centromérico; m, mediano; e t, telomérico). Modificado de Merla et al., 2010

As deleções atípicas também podem ser observadas em pacientes com SWB, no entanto, em uma frequência menor. Microdeleções na região 7q11.23, menores que 1,0 Mb estão frequentemente associadas à características clínicas mais leves, incluindo EASV e boa verbalização. Enquanto que as deleções maiores (> 2,0 Mb) estão associadas à fenótipos mais graves, como sério comprometimento da função cognitiva e crises convulsivas (Gagliardi et al., 2003).

Em contraste às deleções na região crítica à SWB, as duplicações em 7q11.23 tem emergido recentemente e o amplo espectro clínico ainda precisa ser bem delineado. No entanto, é evidente que as duplicações nesta região levam a aspectos clínicos mais leves e distintos daqueles encontrados em pacientes com SWB (Van der Aa et al., 2009; Merla et al., 2010).

Um dos aspectos mais distintos está associado à linguagem, sugerindo assim que genes específicos nesta região possam ser sensíveis às mudanças de dosagem gênica (Berg et al., 2007).

1.2.2. Síndrome de Smith-Magenis (deleção 17p11.2)

A síndrome de Smith-Magenis (SSM; OMIM #182290, *607642) é considerada uma doença neurocomportamental, causada pela haploinsuficiência do gene *RAI1* (*retinoic acid-induced 1*), localizado em 17p11.2 e caracterizada por DI, comportamento auto-destrutivo, distúrbios do sono, obesidade e alterações esqueléticas e craniofaciais (Elsea e Girirajan, 2008).

A prevalência está estimada em 1:15.000 a 1:25.000 (Juyal et al., 1996) e é causada principalmente por deleções de novo. No entanto, estima-se que 3-5% dos pais sejam mosaicos para a alteração em 17p11.2 ou carregadores de mutações no gene *RAI1* (Zori et al., 1993).

Aproximadamente 90% dos pacientes com SSM possuem microdeleções na região 17p11.2, causadas por recombinação não homóloga entre blocos de LCRs (Figura 4). A maioria das CNVs nesta região ocorre entre os blocos de LCRs SMS-REPs proximal e distal, levando a uma deleção típica de ~3,7 Mb (Chen et al., 1997).

Deleções atípicas e duplicações atípicas nesta região também podem ser encontradas, tais como alterações maiores, com tamanho de ~5 Mb, presentes em cerca de 5% dos pacientes. E ainda, 16% dos casos podem apresentar tamanhos de deleção variados de acordo com a recombinação entre os diferentes blocos de LCRs presentes nesta região (Shaw et al., 2004; Shaw e Lupski, 2005).

Figura 4 - Representação da região 17p11.2 e os tamanhos de deleção mais frequentes na SSM. As LCRs e as sequências de alta homologia favorecem os rearranjos nesta região e estão representados pelos retângulos vermelhos. Modificado de Elsea e Williams, 2011 e Girirajan et al., 2006

1.2.3. Síndrome de microduplicação alélica em 17p11.2

A síndrome da duplicação de 17p11.2 tem a mesma incidência da SSM e é também conhecida como Síndrome de Potocki–Lupski. As características clínicas incluem DI moderada a grave, dificuldades de locomoção, alterações cardíacas, distúrbios do sono, hiperatividade e autismo, além de alterações craniofaciais e deformidades nos membros (Treadwell-Deering et al., 2010).

Por apresentar sinais clínicos mais sutis, a Síndrome de Potocki-Lupski é de difícil diagnóstico. O tamanho das duplicações pode variar entre 400 kb a 13,3 Mb, sendo mais frequente a duplicação de 3,7 Mb (Zhang et al., 2010).

1.2.4. Síndrome de Alagille (deleção 20p11.2)

Desde os primeiros relatos da síndrome (ALGS; OMIM 118450) realizado por Alagille (1969 e 1975), Watson e Miller (1973), a prevalência tem sido estimada em 1:70.000, considerando a presença de alterações no fígado. No entanto, esses dados não levam em conta a variabilidade e a baixa penetrância presente nesta síndrome (Turnpenny e Ellard, 2012).

A síndrome de Alagille é uma doença que afeta a via de sinalização chamada “Notch”, responsável por alterações no fígado, coração, esqueleto, olhos, rins, sistema nervoso central e distúrbios faciais. Entre as características clínicas, estão presentes colestase crônica devido à redução de ductos biliares, cardiopatia congênita (estenose de artéria pulmonar) distúrbios faciais (fronte ampla), vértebra em formato de borboleta, retinopatia pigmentar, hemorragia intracraniana e rins displásicos (Turnpenny e Ellard, 2012).

A maioria dos casos (~97%) apresenta haploinsuficiência do gene *JAG1*, localizado na região 20p11.2, seja por mutações ou por deleções neste locus. Uma pequena minoria apresenta mutações no gene *NOTCH2*, responsável principalmente por malformações renais (McDaniell et al., 2006).

As deleções em *JAG1*, na região 20p12, foram encontradas em aproximadamente 7% dos casos, abrangendo uma região crítica de 5,4 Mb. Deleções maiores também já foram descritas e estão associadas à dificuldade de aprendizado (Giannakudis et al., 2001).

1.2.5. Síndromes de Prader-Willi e Angelman (deleção 15q11-q13)

As síndromes de Prader-Willi (SPW; OMIM 176270) e Angelman (AS; OMIM 105830) são amplamente conhecidas pela sua associação com imprinting

genômico. SPW e AS ocorrem em uma frequência de 1:15.000 a 1:25.000 nascidos vivos (Ledbetter et al., 1981).

Na SPW as características clínicas incluem baixo peso ao nascimento, hipotonia, dificuldades de alimentação na infância e a partir desta fase, os pacientes apresentam hiperfagia e obesidade na adolescência. Os pacientes com esta síndrome também apresentam baixa estatura, mãos e pés pequenos, dismorfismos faciais, DI com comportamento obsessivo-compulsivo. Em ambos os sexos, há presença de hipogonadismo e infertilidade na maioria dos casos (Cassidy e Driscoll, 2009).

Por outro lado, na SA os pacientes apresentam microcefalia, ataxia de marcha, DI grave, redução ou ausência da fala, convulsões e alteração no sono. Os indivíduos afetados possuem comportamento característico da síndrome, com aparência constante de felicidade, incluindo risos e excitabilidade sem motivo (Dagli et al., 2012).

Em ambas as síndromes os pacientes apresentam uma deleção intersticial em 15q11q13. A utilização de técnicas moleculares permitiu verificar que as deleções estavam associadas à perda de material genético de origem paterna na SPW e perda de material genético de origem materna em AS, caracterizando a presença de *imprinting* genômico nesta região (Buiting, 2010).

A maioria dos pacientes de SPW (~70%) apresenta deleções de 5 a 7 Mb na região 15q11q13 no alelo paterno. As deleções ocorrem devido à recombinação não homóloga entre sequências repetitivas. Deleções atípicas maiores podem ocorrer em casos mais raros (Carrozzo et al., 1997).

O segundo rearranjo mais frequente na SPW é a dissomia uniparental materna, presente em 25-30% dos casos. Essa alteração ocorre devido a uma não disjunção na meiose materna, seguida por uma perda mitótica do cromossomo 15 paterno após a fertilização (Robinson et al., 2000).

Na AS, as deleções ocorrem na região 15q11q13 do alelo materno em ~70% dos casos. O mecanismo de rearranjo nos pacientes com SA também é muito semelhante à SPW, sendo que ~90% dos pacientes apresentam a deleção típica e outros 10% possuem deleções maiores (Carrozzo et al., 1997). Na SA,

alguns casos apresentam dissomia uniparental paterna (2-5%) e em 10% dos pacientes há mutações pontuais no gene *UBE3A* (Figura 5) (Mabb et al., 2011).

Figura 5 - Representação das alterações moleculares das SPW e AS, na região 15q11.3. Modificado de Buiting, 2010

A maioria dos casos é esporádica com um risco de recorrência baixo. Em 20% das mutações em *UBE3A* nos pacientes com SA, as mães carregam a mesma mutação, apresentando assim, um risco de recorrência de 50%. Embora o risco nos casos com mutações de novo seja considerado baixo, a presença de mosaicismo materno precisa ser considerado (Clayton-Smith and Laan, 2003).

1.2.6. Síndrome de deleção em 22q11.2

As microdeleções na região 22q11.2 podem ser observadas não apenas nos pacientes com Síndrome de DiGeorge (SDG), mas sim em outras malformações incluindo a síndrome velo-cardio-facial (SVCF), síndrome de CHARGE e síndrome da anomalia facial conotruncal, agrupadas posteriormente em uma única, a síndrome de deleções de 22q11.2 (Gennery et al., 2012).

Embora a incidência da síndrome de deleções de 22q11.2 seja estimada em 1: 4.000 nascidos vivos, ela ainda não está bem estabelecida, pois nem todos os recém-nascidos fazem teste de triagem para a síndrome. Pode escapar desta estimativa, pacientes que apresentam anomalias letais ou pacientes assintomáticos e/ou com características leves (Scambler et al., 2000).

As alterações fenotípicas incluem mais de 180 anomalias congênitas, dificuldade de aprendizado, problemas psiquiátricos e alteração imunológica (Molesky et al., 2011). Sendo assim, os pacientes que apresentam alterações na região 22q11.2 possuem um espectro fenotípico muito amplo.

As deleções mais frequentes nos pacientes com SDG (~87%) possuem tamanho aproximado de 3 Mb, abrangendo cerca de 48 genes. Já as deleções menores, com 1,5 Mb, aparecem em uma frequência um pouco menor (8%) incluindo ~28 genes. Assim como em outras síndromes de microdeleções, a presença de LCRs nestas regiões favorece o mecanismo de recombinação não homóloga, levando às alterações no número de cópias gênicas (Emanuel, 2008).

Deleções atípicas menores na região 22q11.2 (Figura 6) também tem sido descritas na literatura, no entanto, os aspectos clínicos na SDG são altamente variáveis, dificultando a associação genótipo-fenótipo (Williams, 2011).

Figura 6 - Representação da região 22q11.2 e os tamanhos de deleção mais frequentes na síndrome de DiGeorge. As LCRs estão representadas pelas letras A-H. Modificado de Nogueira et al., 2008

Em casos mais raros, alterações em 10p13 levam a alterações fenotípicas semelhantes à DS (Yatsenko et al., 2004).

Um dos principais genes candidatos às alterações fenotípicas na SD é o gene *TBX1*, responsável pela formação da crista neural. Em estudos com modelo animal, haploinsuficiência do gene *TBX1*, pode levar à alterações faciais, hipoplasia do timo e paratiróide (alterações imunológicas) e alterações cardíacas (Gennery et al., 2012).

1.2.7. Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p-)

A síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH; OMIM 194190) ocorre devido à deleções subteloméricas no braço curto do cromossomo 4 e ocorre em uma frequência de 1:50.000 nascidos vivos. Na maioria dos casos, a SWH é causada

por deleções *de novo* com tamanho de ~5,0 Mb na região 4p16 (Battaglia et al., 2001).

As características clínicas da SWH incluem alterações craniofaciais, hipertelorismo, hipotonia, DI, atraso no crescimento, microcefalia, agenesia de corpo caloso, epilepsia e problemas de fala (Bergemann et al., 2005).

O mecanismo de origem das deleções ainda não é bem claras. Alguns trabalhos na literatura sugerem que as regiões subtelôméricas sejam mais favoráveis aos rearranjos cromossômicos, provavelmente por necessitar apenas de um ponto de quebra, diferentemente das síndromes de deleção intersticial (Bergemann et al., 2005).

No restante dos casos, podem ser encontrados outros rearranjos, incluindo cromossomo 4 em anel, deleções de 4p16 em mosaico ou até mesmo serem resultado de translocações não balanceadas (Dallapiccola et al., 1993). As deleções maiores também estão presentes nos casos com SWH, estendendo até a região 4p14.

A alta variabilidade no tamanho das deleções na região 4p16 pode levar a um amplo espectro fenotípico para a SWH. Embora mais da metade dos casos sejam diagnosticados pela técnica de citogenética convencional (banda G), algumas deleções são observadas apenas por técnicas moleculares mais acuradas, deixando assim diversos casos sem diagnóstico para a síndrome (Sifakis et al., 2012).

O risco de recorrência para a SWH depende do mecanismo de origem da deleção. Para os casos com deleção de novo, o risco é considerado muito baixo. Em aproximadamente 20% dos casos, os pais são portadores de uma translocação balanceada (t4;8)(p16;23) e para estes casos, há um risco de recorrência próximo à 50% (South et al., 2008).

1.2.8. Síndrome de Cri-du-chat (5p-)

A síndrome de Cri-du-Chat (SCdC; OMIM 123450) foi descrita inicialmente em 1963, onde os pacientes apresentavam perda total ou parcial do braço curto do cromossomo 5 (5p-) e na infância, um choro agudo semelhante ao miado de um gato. A incidência para essa síndrome pode variar entre 1:15.000 a 1:50.000 (Higurashi et al., 1990; Mainardi, 2006).

Além do choro característico na infância, os pacientes com SCdC apresentam também baixo peso ao nascimento, microcefalia, fácies típico, hipotonia, DI e atraso psicomotor graves. Outras malformações incluem alterações cardíaca, renal e ocular (Rodríguez-Caballero et al., 2010).

A maioria dos pacientes com SCdC (mais de 80% dos casos) apresenta deleções *de novo* no braço curto do cromossomo 5, sendo que o tamanho das deleções podem variar desde a região 5p15.3 até a perda total do braço curto. Embora as deleções sejam predominantes na SCdC (intersticial ou terminal), outros rearranjos cromossômicos também foram observados em pacientes com esta síndrome (aproximadamente 10% dos casos), incluindo translocações, inversões e mosaico de 5p- (Cerruti et al., 2001).

Com o avanço das novas técnicas moleculares para a identificação de CNVs, foi possível também, identificar de forma mais acurada o tamanho das deleções e associá-las às alterações fenotípicas, além de permitir a identificação de novas alterações genômicas, atribuídas mais tarde à novas síndromes de microdeleções / microduplicações (Slavotinek, 2008).

1.3. Alterações subteloméricas e fenótipos clínicos

As regiões subteloméricas, encontradas na porção final de cada cromossomo, são amplamente conhecidas por apresentarem grande quantidade

de genes. Assim, alterações nessa região são frequentemente associadas a pacientes com DI de origem idiopática e cariótipo normal (Ledbetter e Martin, 2007; Christofolini et al., 2010).

Os telômeros apresentam regiões ricas em sequências repetitivas. Entre elas estão as sequências ricas em repetições (TTAGGG)_n, além de uma complexa família de DNA repetitivo, que favorece o aparecimento de deleções e duplicações por mecanismos de recombinação. A detecção de CNVs subteloméricas pode ocorrer em 3 a 6% em pacientes com DI isolada, sendo que esta taxa pode ultrapassar 10% quando associada à anomalias congênitas (Ledbetter e Martin, 2007; Rodriguez et al., 2008).

No entanto, nas alterações subteloméricas, alguns casos não conseguem ser identificados pela técnica de bandamento convencional, uma vez que estas alterações ocorrem em tamanho submicroscópico ou porque esta região está sendo mascarada por outra alteração próxima e de mesmo tamanho (Slavotinek, 2008).

Essas CNVs presentes nos subtelômeros são frequentemente associadas à DI, que por sua vez é caracterizada pela redução significativa da cognição e quociente de inteligência (QI) com valores menores a 70 (Rooms, Reyniers and Kooy, 2005).

A DI afeta aproximadamente 1 a 3% da população geral, sendo que a grande maioria apresenta DI leve (valores entre 50 e 70) e menos de 0,5% dos indivíduos apresenta DI moderado a grave, com QI abaixo de 50 (Stegmann, 2008; Rooms, Reyniers and Kooy, 2005).

Por outro lado, as crianças com idade inferior a cinco anos, onde os testes de QI não são aplicados, passa a ser avaliado o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM).

O ADNPM é definido, então, como um atraso significativo de dois ou mais fatores, que inclui atraso motor, de fala e linguagem, cognição e comportamental, (Shevell et al., 2003; Tirosh et al., 2011), embora alterações de neurodesenvolvimento podem estar presentes na população, apenas como uma

manifestação isolada da doença, ou acompanhada de outras manifestações fenotípicas, englobando as anomalias congênitas (AC).

Desta forma, a detecção de CNVs subteloméricas fica limitada ao poder de resolução das técnicas de bandamento G, necessitando assim, de metodologias de genotipagem molecular mais acuradas para a investigação de alterações submicroscópicas.

1.4. Análise molecular das CNVs

1.4.1. Triagem molecular por MLPA

Com o aprimoramento da citogenética molecular, especialmente o surgimento da tecnologia de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), já é possível identificar alterações genômicas menores que 5 Mb. A técnica de MLPA foi desenvolvida de forma a permitir a detecção do número de cópias genômicas de regiões de interesse, diagnosticando anormalidades genéticas como aneuploidias, deleções e duplicações em um único ensaio. Esse método permite a triagem genômica quantitativa de sequências alvo-específicas, baseado na hibridação simultânea e amplificação por PCR de até 50 sondas diferentes em uma única reação (Schouten et al., 2002) (Figura 7).

Denaturação e hibridação

Ligação

Amplificação das sondas

Análise dos fragmentos

Figura 7 - Técnica de MLPA, mostrando as etapas de denaturação, hibridação, ligação, PCR e análise dos fragmentos gerados por sequenciamento capilar. Adaptado de <http://www.mlpa.com>

Para identificar as diferentes sondas utilizadas no mesmo experimento, cada sonda possui um tamanho determinado e único, variando entre 130 a 480 nucleotídeos, que posteriormente podem ser visualizados em eletroforese capilar (Schouten et al., 2002).

Já foram desenvolvidos mais de 400 kits diferentes de MLPA (www.mlpa.com), cada um deles com uma combinação de sondas diferentes, com o objetivo de identificar alterações no número de cópias em regiões específicas do genoma ou até mesmo em genes específicos. Alguns destes kits foram elaborados de forma a identificar as microdeleções e microduplicações mais frequentemente associadas a fenótipos relacionados a DI (Christofolini et al., 2010).

Em um único teste, a técnica de MLPA permite a detecção de vários *loci* simultaneamente, apresentando um amplo espectro diagnóstico tais como: a síndrome da deleção 22q11.2, Síndrome de Williams, Síndromes de Angelman e Prader-Willi, Síndrome de Smith-Magenis e Síndrome de Miller-Dieker. Além disso, pode ser utilizada para pacientes com suspeita clínica de microdeleções ou microduplicações subteloméricas de uma maneira mais simples e rápida, já que permite a avaliação de todos os subtelômeros humanos em uma única reação.

Desta forma, o MLPA surge como uma tecnologia mais econômica e menos trabalhosa do que as técnicas de análise de marcadores polimórficos ou FISH, também utilizadas para a triagem de microdeleções (Fernández et al., 2005; Vorstman et al., 2006; Dutra et al., 2012).

1.4.2. Triagem molecular por oligoarrays

Uma técnica desenvolvida mais recentemente, o *microarray* utilizando oligos, permite a detecção de microalterações genômicas com um alto nível de resolução (cerca de 0,7 kb), o qual varia de acordo com a plataforma utilizada, os tipos de sondas e sua distribuição no genoma (Sigberg et al., 2012; Vissers et al., 2010; Manning e Hudgins, 2010).

O diagnóstico por *oligoarrays* tem sido empregado no diagnóstico de pacientes com DI e/ou anomalias congênitas múltiplas e cariótipo em bandamento G prévio normal.

A maioria das técnicas de *oligoarrays* tem a capacidade de detectar, em um único teste, ganhos e perdas submicroscópicas de todo o genoma, incluindo mosaicismo e aneuploidia (Edelmann e Hirschhorn, 2009; Slavotinek, 2008). Estas alterações afetam o quadro fenotípico uma vez que podem alterar os níveis de transcrição, a sequência, a estrutura e a função de diferentes genes (Feuk et al., 2006 e Stankiewicz e Beaudet, 2007).

Portanto, o método de *oligoarrays*, pode aumentar a taxa de detecção de desequilíbrios sutis nos cromossomos e diagnosticar pacientes com fenótipo clínico sem etiologia conhecida (Gijsbers et al., 2009).

Recentemente, as plataformas de sequenciamento em grande escala (*Next Generation Sequencing – NGS*), tem ampliado ainda mais a relação genótipo-fenótipo (EXOMA), nos casos com AC/ DI / ADNPM (Vergult et al., 2014).

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Investigar a presença de CNVs utilizando a técnica de MLPA com os kits específicos: P064 (microdeleções), P036 e P070 (subteloméricos); para o diagnóstico molecular de portadores de anomalias congênitas associadas a DI e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.
- Realizar a técnica de oligoarray em pacientes que apresentaram CNVs em mais de duas regiões diferentes no genoma, identificados previamente pela técnica de MLPA.
- Associar as CNVs encontradas com o fenótipo clínico dos pacientes.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Participaram do estudo prospectivo 416 pacientes, sendo 172 pacientes do gênero feminino e 244 do gênero masculino. A idade dos pacientes variou desde 8 meses de vida até os 28 anos e dois meses, com média de idade de 10 anos e seis meses.

Todos os pacientes foram atendidos na Unidade de Genética Clínica do Instituto da Criança (ICr) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) entre janeiro de 2011 e janeiro de 2014.

Foram incluídos nesse estudo pacientes portadores de AC associadas ao ADNPM e/ ou DI, que apresentavam cariótipo em bandamento G prévio normal ou considerado insuficiente para a conclusão diagnóstica e clínica.

O material genético dos pais também foi analisado. Além disso, os pais e/ou responsáveis foram informados da realização da pesquisa, assinando um termo de consentimento informado aprovado pelo comitê de ética da instituição - CAPPesq nº 0282/11.

Todos os pacientes passaram por anamnese detalhada, abordando dados de: identificação, história clínica evolutiva, desenvolvimento neuropsicomotor, antecedentes gineco-obstétricos maternos, história familiar, heredograma e exames complementares.

O exame físico dos pacientes foi realizado por geneticistas clínicos da Unidade de Genética do ICr-FMUSP, por meio da descrição detalhada do fenótipo e pela aferição antropométrica.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, foi obtido do probando e/ou genitores 4 mL de sangue periférico, utilizando como anticoagulante o EDTA. O material genético foi extraído pelo QIAamp DNA Blood Midi Kit (250) (QIAGEN, Valencia, Califórnia) segundo protocolo fornecido pelo fabricante com algumas modificações, incluindo a redução do volume de eluição, de 250 µL para 150 µL. Esta modificação possibilitou uma concentração maior de DNA genômico, ideal para futuras repetições, se necessário, e para a alta sensibilidade das reações de MLPA.

Para evitar nova coleta de sangue, principalmente nos pacientes, uma alíquota de sangue de 400 µL foi armazenada a -20°C. Estas alíquotas foram mantidas no laboratório até a confirmação da qualidade das amostras de DNA e a conclusão dos resultados moleculares, sendo posteriormente descartadas. Apenas as amostras de DNA foram preservadas no laboratório.

Devido à alta sensibilidade da técnica de MLPA, o processo de extração de DNA sofreu algumas modificações, mesmo com a utilização de kits comerciais. Durante o processo de aperfeiçoamento da técnica, a velocidade e o tempo de centrifugação foram aumentados, evitando retenção de amostra na coluna de sílica. Na etapa de eluição das amostras, a redução do volume aplicado na coluna de sílica, permitiu uma concentração maior de DNA, ideal para a alta sensibilidade das reações de MLPA.

Em seguida à extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanoview - GE®) e as amostras para uso imediato foram diluídas em TE (Tris-EDTA 10:1) com concentração final de 50 ng/µL. Os tubos com DNA total foram armazenados em freezer com temperatura -80°C.

3.2.2. Reações de MLPA

Para a investigação molecular dos pacientes presentes no estudo foram utilizados três kits comerciais. Os kits P036 e P070 possibilitam a investigação de alterações subteloméricas de todos os cromossomos. Já o kit P064 (*Microdeletion Syndromes*) possibilita a detecção de microdeleções e microduplicações em diversas regiões do genoma: deleção 1p – região 1p36-1pter; Síndrome de Williams – região 7q11.2; Síndrome de Smith-Magenis – região 17p11.2; Síndrome de Miller-Dieker – região 17p13.3; Síndrome de DiGeorge (Velocardiofacial) – região 22q11.21; Síndrome de Prader-Willi/Síndrome de Angelman – região 15q11.2; Síndrome de Alagille – região 20p12.2, gene *JAG1*; Síndrome de Saethre-Chotzen – região 7p21, gene *TWIST1*; Síndrome de Sotos – região 5q35.3, gene *NSD1*.

As sondas presentes em cada kit de MLPA (P036, P064 e P070), bem como as sequências estão detalhadas no Anexo G.

Quando possível, algumas alterações puderam ser confirmadas com kits específicos para as regiões de interesse. Nestes casos, foram utilizados os kits de MLPA P250, específico para as alterações em 22q11.23 e P029 específico para as alterações presentes em 7q11,23.

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com os protocolos do fabricante dos kits probemix (MRC-Holland®, Amsterdam, The Netherlands) também com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes.

Por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em todas as reações de MLPA foram utilizados controles normais. A escolha dos controles ocorreu ainda no processo de padronização da técnica de MLPA, onde foram incluídas cinco amostras genômicas de pessoas consideradas fenotipicamente normais. Das cinco amostras, elegemos três que apresentavam número de cópias normais para todas as sondas. Assim, cada corrida de MLPA apresentava além dos três controles normais, uma amostra positiva para cada kit de MLPA.

No protocolo das reações de MLPA cada kit comercial permitia a realização de 100 reações. Em protocolo adaptado pela Dra. Fernanda Sarquis Jehee (USP) e bem estabelecido em outro centro diagnóstico, o mesmo kit pôde ser utilizado para aproximadamente 300 reações, aumentando assim o custo-benefício desta técnica.

Aproximadamente 250 ng de DNA genômico (5 μ L) foram adicionados a um microtubo e levados ao termociclador (Veriti® Thermal Cycler – Life Technologies) para denaturação a 98 °C por 15 minutos. Em seguida, uma mistura das sondas (específicas para cada kit) e solução tamponada foi adicionada ao DNA denaturado, para o processo de hibridação das sondas de MLPA ao DNA a 60°C por 3 horas.

Sem retirar os tubos do termociclador, as soluções tamponadas juntamente com a enzima ligase, foram adicionadas à solução de hibridação para a ligação das sondas em cada região alvo específica a 54°C por 15 minutos. Na última etapa, em temperatura ambiente, devido a *Taq* Polimerase ser termoestável, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados à solução de ligação, para a amplificação (reação de PCR – *Polymerase Chain Reaction*) somente dos fragmentos unidos pela ligase.

3.2.2.1. Preparação das amostras para eletroforese capilar

Após o processo de amplificação, cada amostra foi diluída em água ultrapura (1:10). Apenas 1,0 μ L do produto diluído foi levado à microplaca com 9,0 μ L de Formamida HiDi (Life Technologies) e 0,075 μ L de marcador de peso molecular (LIZ - GS600). Antes de levar ao equipamento de eletroforese capilar, as amostras foram denaturadas em termociclador por cinco minutos à 98 °C e em seguida levadas ao gelo para manter as fitas separadas.

A placa com as amostras foi levada ao sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies) para as reações de separação de fragmentos, seguindo os seguintes parâmetros (Quadro 1), específicos para as reações de MLPA.

Temperatura do equipamento	60 °C
Tempo de corrida	2700 segundos
Voltagem da corrida	15 KVolts
Tempo de Pré-corrida	180 segundos
Voltagem da Pré-corrida	15 KVolts
Tempo de injeção	15 segundos
Voltagem de injeção	1,6 KVolts

Quadro 1 - Parâmetros de corrida para equipamento de eletroforese capilar ABI 3500 (Life Technologies), com capilar de 50 cm e filtro G5, com capacidade de leitura para 5 diferentes fluorescências (Dye)

3.2.2.2. Análise dos resultados de MLPA

Os dados foram gerados por sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies), em arquivo com extensão .fsa, a partir da Rede de Equipamento Multiusuário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (nos laboratórios de Imunologia do Instituto do Coração – INCOR e Genômica Pediátrica – LIM 36).

A análise dos resultados da reação de MLPA foi realizada utilizando o *software* GeneMarker® (Softgenetics, LLC, State College, PA - www.softgenetics.com).

Todos os resultados foram confirmados por um segundo *software* de análise, o Coffalyser.NET, específico para reações de MLPA e disponível gratuitamente pela empresa MRC-Holland

Os resultados foram considerados alterados quando o tamanho do pico relativo foi menor do que 0,75 (deleção) ou maior do que 1,25 (duplicação) quando comparado a amostras normais. O resultado final da análise gerou um gráfico com todas as sondas do kit de MLPA juntamente com os valores limites para normalidade e uma tabela de número de cópia genômica para o grupo de sondas utilizado no kit específico.

Resultados alterados foram checados por reações independentes e comparados aos bancos de dados de variação genômica DGV (*Database of Genomic Variants* - (<http://projects.tcag.ca/variation/>) e DECIPHER (www.decipher.com). Essa consulta aos bancos de dados foi realizada devido a possíveis regiões polimórficas presentes nas sequências próximas às sondas, regiões estas conhecidas como CNVs de significado clínico incerto.

3.2.3. Triagem genômica comparativa por oligoarrays

Com o objetivo de identificar possíveis rearranjos complexos, a presença de duas ou mais alterações no número de cópias gênicas triadas pela técnica de MLPA (Kits P036, P070 e P064), permitiu que 15 amostras fossem investigadas detalhadamente pela técnica de oligoarray.

Em dois pacientes, os experimentos de array foram realizados pela plataforma CytoScan™ Affymetrix® (Santa Clara, Califórnia) utilizando chips (HD array 6.0 Affymetrix®), seguindo as instruções do fabricante e cedidos pela empresa Affymetrix.

Em outros 12 pacientes, foram realizadas reações de *array* em duas plataformas:

3.2.3.1. CGH-array – plataforma Agilent

Amostras de cinco pacientes foram analisadas utilizando a lâmina de CGH-array Agilent SurePrint G3 Genoma Humano microarray 180K (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), contendo aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos com um espaçamento médio de 17 kb entre as sondas.

As análises para esta plataforma foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Citogenética e Genômica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Portugal (bolsa FAPESP BEPE n° 2012/25247-6).

As reações de CGH-array, foram iniciadas a partir de 1.100ng de DNA em volume final de 26 µL tanto para as amostras dos pacientes quanto para o DNA de referência da Agilent (amostra controle).

O DNA dos pacientes foi marcado com fluorescência cianina 5-dUTP (Cy5) de acordo com as orientações do fabricante. Por outro lado, o DNA das amostras controles, obtidos a partir da Agilent®, foram marcados com cianina 3-dUTP (Cy3). Nesta etapa, iniciadores (*primers*) específicos foram adicionados às amostras.

Na próxima etapa, o excesso de *primers* e oligos foram removidos utilizando colunas de purificação individuais Amicon de 30kDa (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). As amostras de DNA marcados com Cy5 (paciente) e Cy3 (controle) foram combinados com DNA humano Cot-1(Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Netherlands) e tratados com agente bloqueador e tampão 2X Hi-RPM Agilent®.

As amostras foram então hibridadas em lâmina 4x180K (ISCA), a 65 ° C durante 24 horas em forno de hibridação específico (Agilent® Technologies) e a uma rotação constante. Em seguida, a lâmina foi levada para uma estação de lavagem com soluções específicas para a retirada dos oligos que não foram hibridados.

Após a lavagem, os *arrays* foram transferidos para um equipamento de

leitura (*scanner* C-Agilent®), e a intensidade dos sinais foi mensurado com o auxílio de *softwares* específicos disponibilizados pelo fabricante, como o Agilent Genomic Workbench® versão 6.5.

3.2.3.2. SNP *array* – plataforma Illumina

Para sete pacientes participantes do estudo, o melhor delineamento dos pontos de quebra foi possível utilizando a plataforma de SNP *array* Illumina. O chip HumanCytoSNP-12 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, Califórnia) compreende um painel de triagem do genoma, incluindo ~300.000 sondas de SNPs que cobrem todo o genoma e sondas alvo para todas as regiões de importância citogenética conhecida, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e cromossomos sexuais (www.illumina.com).

A amplificação do DNA, marcação e hibridação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. As lâminas de SNP *array* foram escaneadas no iScan Reader e a análise dos dados foi realizada utilizando o *software* da Illumina GenomeStudio versão 2010.1 e o KaryoStudio versão 1.4.3.0 Build 37 (CNV Plugin V3.0.7.0).

3.2.3.3. Análise de bioinformática

Para a identificação de alterações potencialmente patogênicas, entre todos os resultados moleculares obtidos pela técnica de oligo*array*, as CNVs foram classificadas seguindo dois principais passos:

Primeiro, todas as alterações foram comparadas ao banco de dados de variação genômica *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Em seguida, as características clínicas dos pacientes foram comparadas ao fenótipo de casos com a mesma alteração, presente no banco de dados DECIPHER *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (<http://decipher.sanger.ac.uk/>).

Considerando os dados presentes em ambos os bancos de dados genômicos, foi possível classificar as CNVs em quatro principais classes:

- Classe I - Deleção ou duplicação em região associada à síndrome de microdeleção ou microduplicação.
- Classe II - Deleções ou duplicações que não estão descritas na DGV até à presente data e envolvem genes codificantes conhecidos.
- Classe IIIA - Deleções ou duplicações que, até a presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV.
- Classe IIIB - Deleções ou duplicações que, até a presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV, não envolvendo genes codificantes conhecidos.
- Classe IV - Deleções ou duplicações reportadas em indivíduos normais na DGV.

Sendo assim, consideramos CNVs potencialmente patogênicas as alterações que se encaixavam principalmente nas classes I e II.

Já as variações presentes nas Classes IIIA e IIIB, possuem um significado ainda incerto na patogênese das malformações congênitas e DI, e são hoje, conhecidas como variantes de significado clínico incerto (VOUS do inglês, *variants of uncertain clinical significance*).

Consideramos as CNVs como benignas, as alterações presentes na classe IV, em que as alterações não apresentavam associação com o fenótipo clínico do paciente, e que apresentaram polimorfismos já descritos nos bancos de dados de amostras normais na população.

4. RESULTADOS

A técnica de MLPA foi realizada em 416 amostras de DNA de pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, que apresentavam cariótipo normal por bandamento G.

A análise molecular pela técnica de MLPA permitiu detectar microdeleções e/ou microduplicações em 97/416 pacientes (23,3%): em 46 pacientes foi possível encontrar alterações utilizando apenas o kit P064 (microdeleções), em 34 pacientes utilizando apenas os kits P036 e P070 (regiões subteloméricas) e em 4 pacientes só foi possível identificar a alteração utilizando outro kit de MLPA (P250), específico para anormalidades em 22q11.2. A cobertura do genoma utilizando a combinação desses kits pode ser visualizada no gráfico abaixo (Figura 8).

Foram considerados atípicos os pacientes que apresentavam alterações com tamanhos diferentes daqueles observados nos casos clássicos para as síndromes apresentadas no presente estudo.

Figura 8 - Imagem representativa das regiões no genoma com a localização das sondas de MLPA utilizando uma combinação de kits comerciais. Cada kit de MLPA está representado pelas cores: P036 – azul; P064 – verde; P070 – vermelho; P250 – amarelo; P029 – laranja

Em 13 pacientes, a combinação de kit de MLPA permitiu identificar alterações que estavam presentes tanto no kit P064 (microdeleções) quanto nos kits P036 e P070 (regiões subteloméricas). No gráfico a seguir (Figura 9), é possível visualizar a frequência de amostras detectadas pelos kits de MLPA disponíveis para o estudo.

Figura 9 - Gráfico com todas as alterações encontradas utilizando a técnica de MLPA

Os rearranjos citogenômicos ocorreram por mutações *de novo* em 59/97 pacientes (60,8%) e herdado de um dos pais em oito casos (8,2%). Em 30/97 casos (31,0%) não foi possível a coleta de amostras de sangue de um dos genitores para o estudo molecular.

4.1. Principais síndromes de microdeleções encontradas pelo kit P064

Utilizando apenas o kit P064, foram encontradas CNVs em 46/97 pacientes (47,4%) constituído principalmente por 26 pacientes com microalterações na região 22q11.2 (típicos e atípicos) e 20 pacientes com microdeleção / microduplicação em 7q11.23. Outros 14 pacientes apresentaram alterações pelos três kits de MLPA (Tabela 4).

Tabela 1 – Alterações encontradas pelo kit P064 para as principais síndromes de microdeleções

Pacientes	Região	Síndromes
19	del. 7q11.23	Síndrome de Williams
1	del. 7q11.23	Síndrome de Williams
1	dup. 7q11.23	Duplicação em 7q11.23
1	dup. 7p21.1	Duplicação em 7p21.1
23	del. 22q11.2	DiGeorge / Velocardiofacial
3	del. 22q11.2	DiGeorge / Velocardiofacial
1	dup 22q11.2	Duplicação em 22q11
1	del. 1p36	Síndrome 1p36
2	del. 1p36	Síndrome 1p36
3	dup. 5q35	Duplicação em 5q35
1	del. 17p11	Síndrome de Smith-Magenis
1	del. 17p11	Síndrome de Smith-Magenis
1	dup. 17p11	Duplicação em 17p11
1	del. 15q11	Síndrome de Smith-Magenis
1	dup. 15q11	Duplicação em 15q11

Del.: deleção; Dup.: duplicação; *Em alguns casos serão necessários outros testes moleculares para confirmação de alteração típica ou atípica

4.2. Síndrome de deleção 22q11 (DiGeorge / Velocardiofacial)

Entre as principais anormalidades detectadas pelo kit P064, as alterações na região 22q11.23 (Síndrome de DiGeorge / Velocardiofacial – SDG / SVCF) foram as mais frequentes, presente em 26/60 pacientes (43,3%).

Destes, 23 pacientes apresentavam microdeleção típica na região 22q11.2 (3 Mb), responsável pela síndrome de SDG / SVCF. Nestes casos, todos os pacientes apresentaram aspectos fenotípicos característicos da microdeleção

22q11.2, incluindo defeitos cardíacos congênitos, fácies típico e infecções de repetição.

Em três pacientes, algumas sondas para a região 22q11 não apresentavam alterações, considerando assim, casos de microdeleções atípicas. As mesmas alterações atípicas puderam, então, ser confirmadas pelo kit P250, específico para a região crítica da síndrome de deleção em 22q11.2. Esses casos atípicos apresentaram alterações menores que 3 Mb.

As microdeleções menores que 3 Mb foram observadas em dois pacientes do estudo. Os casos V.C.C e F.D.M. apresentavam redução no número de cópias gênicas em quatro sondas (*CLTCL1*, *CDC45*, *CLDN5*, *ARVCF*) das seis presentes no kit P064. Utilizando o kit P250 específico para essa região, foi encontrada uma microdeleção com tamanho aproximado de 1,5 Mb, abrangendo apenas as LCRs A e B.

As características clínicas em ambos os casos foram muito semelhantes e incluem dismorfismos faciais com baixa implantação do cabelo, dificuldade de alimentação, crises convulsivas, perda auditiva bilateral e infecções de repetição. Apenas para o paciente F.D.M. foi relatado em exames complementares, tetralogia de Fallot. Os pais, em ambos os casos, não apresentavam alterações para essa região.

Para o terceiro paciente com microdeleção atípica (B.N.M.F.), foi detectado deleção de apenas uma sonda (*SNAP29*) pelo kit P064. Com o kit P250 foi possível confirmar a deleção atípica de apenas duas sondas (*SNAP29* e *LZTR1*) com tamanho aproximado de 340 kb, entre as LCRs C e D. Embora o paciente não apresentasse fácies típico para a SDG, o paciente foi encaminhado para a genética com atraso no desenvolvimento, DI moderada, imunodeficiência primária, espectro autista, sem cardiopatia congênita. A mesma deleção foi encontrada na mãe e no avô materno, embora ambos não apresentassem alterações fenotípicas.

Para a confirmação da microdeleção em 22q11.2 e a obtenção exata do ponto de quebra da alteração, foi realizada a técnica de *SNP array* (Affymetrix) tanto para o paciente quanto para a mãe e o avô materno.

O resultado molecular por SNP *array*, revelou uma microdeleção na região 22q11.2, com tamanho de 539,4 kb (21,069,073-21,608,479), ou seja, arr[hg19] 22q11.2(21,069,073-21,608,479)x1, compreendendo aproximadamente 20 genes da região crítica para a síndrome de deleção de 22q11. O resultado por SNP *array* realizado também na mãe, revelou uma microdeleção na mesma região com tamanho semelhante ao observado no probando, de aproximadamente 410,3 Mb.

Já o resultado da cariotipagem molecular para o avô materno, revelou uma deleção maior quando comparado aos membros das outras duas gerações. A deleção na região 22q11, observada pela técnica de SNP *array* apresentava tamanho de 907,8 kb, envolvendo aproximadamente 40 genes (Figura 10).

Figura 10 - Resultado das deleções atípicas nas três gerações: probando, mãe e avô materno, envolvendo as LCR B, C e D da região 22q11.2. Os diferentes tamanhos foram obtidos pela técnica de array-CGH

4.3. Síndrome de deleção 7q11.2 (Williams-Beuren)

Para o kit P064, foram observadas também deleções na região 7q11.23, presente em 19/60 pacientes (31,7%). A maioria dos pacientes

apresentava características clínicas compatíveis à Síndrome de Williams-Beuren (SWB), incluindo fâcies típico, cardiopatia congênita (estenose aórtica supravalvar) atraso no desenvolvimento e DI, exceto em um caso, onde o paciente apresentava apenas enurese noturna, distúrbios do sono e estenose pulmonar, com ecocardiograma sem alterações. Para todos os pacientes que apresentavam CNVs em 7q11.23, o kit específico P029 foi utilizado para a confirmação dos resultados (Figura 11).

Figura 11 - Resultados da técnica de MLPA para a região 7q11.23 utilizando dois kits para a confirmação dos resultados (P064 e P020). A seta indica redução do sinal para a sonda *CYLN2* mostrando a deleção (x1) de umas das sondas para SWB

4.4. Microduplicação na região 7q11.2

As duplicações em 7q11.2 ocorrem com menor frequência quando comparado às deleções na mesma região. Quando utilizado o kit P064, um dos pacientes do estudo apresentou uma duplicação em apenas uma (*FZD9*) das seis sondas disponíveis para kit de microdeleções (Figura 12).

A técnica de oligoarray também foi realizada no paciente S.S.S., para a confirmação dos resultados obtidos por MLPA. O resultado molecular revelou uma deleção em outra região, localizada no braço curto do cromossomo 18, na região 18p11.21, com resultado arr[hg19] 18p11.21(14,550,022-14,823,578)x1. A microdeleção de 273,6 kb (14,550,022-14,823,578) envolve apenas o gene *ANKRD30B*.

Em consideração às características fenotípicas, o paciente apresentava assimetria facial (lábios grossos, cílios longos; nariz bulboso e ponte alta), surdez neurosensorial bilateral, coloboma de papila bilateral, criptorquidismo, ADNPM e comportamento amigável. Aos exames complementares, não havia alterações pelo ecocardiograma.

Figura 12 - Resultados da técnica de MLPA para a região 7q11.23 mostrando a duplicação (x3) apenas do gene *FZDA* para os kits P064 e P029. A seta indica aumento do sinal para a sonda *FZD9*

4.5. Alterações encontradas pelo kit específico P250

Para quatro pacientes, só foi possível a identificação de CNVs patogênicas quando utilizado kit específico para a região 22q11.2.

Destes, dois pacientes apresentavam deleção de três sondas na região 8p23.1 (*GATA4*; *MSRA* e *PPP1R3B*). Para os outros dois casos, foram observados duplicação de genes presentes na própria região crítica para a síndrome de deleção de 22q11.2.

Por se tratar de alteração em apenas uma sonda do kit P250, os resultados obtidos pela técnica de MLPA foram comparados ao banco de dados DGV.

4.6. Regiões subteloméricas (kits P036 e P070)

As alterações subteloméricas foram detectadas em 47/416 (11,3%) pacientes com alguma alteração para a técnica de MLPA, sendo que em 26 pacientes foram encontradas CNVs em ambos os kits P036 e P070 (Tabela 2). Para 13 pacientes, as alterações subteloméricas foram observadas juntamente com o kit P064 para microdeleções.

Tabela 2 – Alterações encontradas pela técnica de MLPA por ambos os kits P036 e P070 apenas para as regiões subteloméricas

N de pacientes	Alterações	Genes
1	dup. 2p25.3 / del. 4q35.2	<i>ACP1 / TRIML2; FRG1</i>
1	dup. 3q29 / del. 9p24.3	<i>BDH1; KIAA0226 / DMRT1; DOCK8</i>
4	del. 4p16.3	<i>PIGG</i>
1	del. 4p16.3 / dup. 8p23.3	<i>PIGG / FBX025</i>
1	del. 4q35.2	<i>TRIML2; FRG1</i>
1	del. 4q35.2 / dup. Xq28	<i>TRIML2; FRG1 / VAMP7</i>
1	dup. 4q35.2 / del. 7q36.3	<i>TRIML2; FRG1 / VIPR2</i>
1	del. 5p15.3	<i>PDCD6; CCDC127</i>
1	dup. 5p15.3 / dup. 14q32.3	<i>PDCD6; CCDC127 / MTA1</i>
1	dup. 5p15.3 / del. Xq28	<i>PDCD6; CCDC127 / VAMP7</i>
1	del. 7p22.3 / dup. 12q24.33	<i>ADAP1; UNC84A / ZNF10</i>
1	del. 9p24.3 / dup. 18q23	<i>DMRT1; DOCK8 / RBFA; CTDP1</i>
1	dup. 9p24.3 / del. 18q23	<i>DMRT1; DOCK8 / RBFA; CTDP1</i>
1	dup. 9p24.3	<i>DMRT1; DOCK8</i>
1	dup. 11p15.5	<i>RIC8A; BET1L</i>
1	dup. 12p13.33	<i>SLC6A12 / JARID1A</i>
1	dup. 15q26.3 / del. Xq28	<i>ALDH1A3; TM2D3 / VAMP7</i>
1	dup. 16q24.3	<i>GAS8</i>
1	dup. 22q11.1	<i>RBM11; IL17RA</i>
1	dup. 22q13.3	<i>RABL2B; ARSA</i>
2	del. Xp22.33 / del. Xq28	<i>SHOX / VAMP7</i>
1	dup. Xp22.33	<i>SHOX</i>

Del.: deleção; Dup.: duplicação

Foram observadas, também, alterações presentes em apenas um dos kits subteloméricos. A análise molecular revelou que em seis pacientes foram observadas alterações apenas pelo kit P036, e em 2 pacientes pelo kit P070 (Tabela 3).

Tabela 3 – Rearranjos presentes apenas em um dos kits subteloméricos P036 / P070

Pacientes	P036	Genes	P070
1	-	<i>TRIML2; FRG1</i>	del. 4q35.2
1	-	<i>PP2PAC; CDC34</i>	dup. 19p13.3
3	del. 20p13	<i>SOX12; ZCCHC3</i>	-
1	del. 16p13.3	<i>POLR3K; DECR2</i>	-
1	del. 3q29	<i>BDH1; KIAA0226</i>	-
1	del. 22q13.3	<i>RABL2B; ARSA</i>	-

Del.: deleção; Dup.: duplicação

4.7. Tipos de alterações encontradas pelos kits P036 e P070

Entre os pacientes estudados, a frequência de deleções na região 4p16.3 foi maior quando comparado às outras regiões subteloméricas. Para esses quatro pacientes com deleção no braço curto do cromossomo 4, as características fenotípicas se encaixavam na síndrome de 4p-, ou Síndrome de Wolff-Hirschhorn (SWH).

Considerando às características clínicas, os pacientes apresentaram, dismorfismos faciais (protusão dos globos oculares, hipertelorismo, filtro nasal curto, fronte ampla, epicanto, fenda palatina, micrognatia), ADNPM, DI, convulsões, alterações renais e cardiopatia.

Em outros casos, no entanto, as alterações em 4p16.3 estavam acompanhadas de outras variações no número de cópias. Um exemplo desse rearranjo aconteceu com o paciente A.L.P.H., que além de apresentar uma

deleção em 4p16.3, apresentava também uma duplicação na porção subtelomérica do cromossomo 8 na região 8p23.3 (Figura 13).

O paciente apresentava ADNPM, dismorfismos faciais, incluindo hipertelorismo aparente, prega de epicanto, sobrancelha arqueada, ponte nasal alargada e baixa, filtro nasal estreito e bem marcado, boca pequena com discreta restrição na abertura e cantos voltados para baixo, palato alto (ogival). Havia presença de hipospádia peniana. Em exames complementares, foi observada uma comunicação interatrial juntamente com estenose de artéria pulmonar, caracterizando uma cardiopatia congênita.

Figura 13 - Resultados da técnica de MLPA para o paciente A.L.P.H. mostrando duas alterações concomitantes: Uma deleção (x1) na região 4p16 do gene *PIGG* e uma duplicação (x3) no gene *FBXO25* em 8p23

A hipótese diagnóstica inicial foi a Síndrome de SWH, apesar do paciente apresentar algumas características fenotípicas não comumente

encontradas em portadores da síndrome de deleção 4p-. A análise citogenética prévia revelou cariótipo normal para o probando e para os pais.

Ainda nas alterações envolvendo o cromossomo 4, deleções no braço longo (4q) também foram observadas em três pacientes, sendo dois casos com alterações concomitantes à outras regiões do genoma.

O paciente M.M.B.S. apresentava apenas deleção para a região 4q35 (genes *TRIML2*; *FRG1*) observada pelos kits subteloméricos P036 e P070. Entre as características clínicas, podemos destacar a presença de dismorfismos faciais, entre elas, fronte ampla, orelhas displásicas, ponte nasal baixa com narinas invertidas, fenda palatina, microretrognatia e pescoço curto. Outras características fenotípicas incluem baixa estatura, sobreposição de artelhos, broncopneumonia de repetição e ADNPM.

Já para o paciente M.N.A.B. a deleção na região 4q35 também estava acompanhada de uma duplicação no braço longo do cromossomo X, região Xq28, do gene *VAMP7* (Figura 14). O paciente apresentava dismorfismos faciais (sobrancelhas arqueadas, sinofre, orelhas sobredobradas, filtro longo e apagado), otite, alterações nos dedos das mãos (dedos longos e camptodactilia), hipertricose em pernas e costas e testículos retráteis.

Figura 14 - Resultados a partir de MLPA para o paciente M.N.A.P. onde foi possível identificar uma deleção (x1) na região 4q35 uma duplicação (x3) na região terminal de Xq28

Em adição a este último caso, o paciente A.C.O. também apresentava uma deleção na região 4q35.2, no entanto, outra CNV também foi observada pelos kits de MLPA para as regiões subteloméricas P036 e P070, sendo essa uma duplicação na região 2p25.3 compreendendo o gene *ACP1* (Figura 15).

Figura 15 - Resultados de MLPA para o paciente A.C.O., onde as setas indicam as alterações presentes nesse caso: uma deleção (x1) na região 4q35 uma duplicação (x3) na porção final do braço curto do cromossomo 2, região 2p25

O paciente apresentava dismorfismos faciais incluindo face alongada e palato alto ogival, baixa estatura e peso com hábitos marfanóides, mancha acinzentada no cabelo, criptorquidia, ADNPM e apnéia do sono. Em exames complementares, a RNM revelou uma neuro-hipófise ectópica e o ecocardiograma uma valva aórtica bivalvar.

Ainda considerando as alterações subteloméricas, um dos pacientes da casuística apresentava alterações no número de cópias gênicas para os kits de MLPA P036 e P070, e que então pôde ser confirmada a alteração pela técnica de oligoarray.

A análise molecular pela técnica de MLPA para o paciente A.C.P.S. revelou uma deleção em heterozigose da sonda *DOCK8* (x1), localizado na porção

final do cromossomo 9p24.3, e uma duplicação da sonda *CTDP1* (x3), localizado na região 18q23.

O mesmo paciente apresentava dismorfismos faciais, incluindo dolicocefalia, palato alto e filtro longo. Aos quatro anos de idade, iniciou o quadro de crises convulsivas, e em exames complementares foi detectada uma comunicação interatrial pelo ecocardiograma.

A análise pela técnica de CGH-array (Agilent) revelou uma deleção de aproximadamente 4,17 Mb em 9p24.3-p24.2 (199,953-4,366,197), abrangendo cerca de 22 genes na região subtelomérica do braço curto do cromossomo 9. Outra alteração foi confirmada neste paciente, no qual apresentava uma duplicação de ~38,88 Mb, localizada na porção subtelomérica do braço longo do cromossomo 18, na região 18q12.3-q23 (39,129,720-78,012,829) incluindo 169 genes (Figura 16). Assim, o cariótipo molecular apresentou o resultado final: 46,XY,der(9)t(9;18)(p22;q12.2)pat. arr[hg19] 9p24.3p24.2(199,953-4,366,197)x1,18q12.3q23(39,129,720-78,012,829)x3.

Figura 16 - Resultado do CGH-array para o caso A.C.P.S., mostrando uma deleção em 9p24.3-p24.2 (1X) e uma duplicação em 18q12.3-q23

Outras alterações observadas com os kits para as regiões subteloméricas (P036 e P070) foram identificadas no paciente N.C.S.F.. A técnica de MLPA detectou duas duplicações (x3), sendo uma na porção final do braço curto do cromossomo 5 e a outra no final do braço longo do cromossomo 14. As sondas de MLPA *PDCD6* e *CCDC127* estavam localizadas na região 5p15 e a sonda *CCNB1IP1* localizada na região 14q11.2.

Em seguida, a técnica de CGH-array foi realizada para identificar exatamente os pontos de quebra dessas CNVs observadas pelo MLPA e quais genes estariam envolvidos no fenótipo. A duplicação na região 5p15.33-p13.3 apresentava um tamanho aproximado de 33,4 Mb, envolvendo 110 genes. Do mesmo modo, a região 14q11.2-q12 apresentava outra duplicação de aproximadamente 5,8 Mb, envolvendo 157 genes (Figura 17). O resultado final do cariótipo molecular foi: 47,XX+(14)(q22)mat. arr[hg19] 5p15.33-p13.3(37,692-33,434,546)x3,14q11.2-q12(19,361,358-25,127,451)x3.

Figura 17 - Resultado da técnica de CGH-array para o caso N.C.F.S. possibilitando a identificação do tamanho da alteração encontrada previamente por MLPA: duas duplicações (x3), sendo uma em 5p15.33-p13.3 e outra em 14q11.2-q12

O paciente N.C.S.F. com alterações nos cromossomos 5 e 14, possuía dismorfismos faciais (face assimétrica, nariz fino, microftalmia, boca para baixo e hipotonia orofacial), estrabismo convergente, coloboma bilateral da íris, disgenesia de corpo caloso, giro hipocampal e manchas café-com-leite.

4.8. Alterações encontradas pelos kits P064, P036 e P070 em conjunto

Entre os casos presentes neste estudo, 13 pacientes apresentavam deleções ou duplicações pelo kit P064 associado às alterações em outras regiões do genoma pelos kits P036 e P070 (Tabela 4).

Tabela 4 – Rearranjos encontrados por MLPA com os kits de MLPA P064 (microdeleções) e P036 / P070 (subteloméricas)

Casos	Regiões envolvidas		
	P064	P036 / P070	Quantidade de sondas
3	del. 1p36	1p36.33	6
1	dup. 7p21.1	dup. 7p22.3	4
1	del. 7q11.23	dup. Yp11.32 e dup. Yq28	10
2	dup. 5q35.3	del. 2q37.3 / dup. 5q35.3	5
1	dup. 5q35.3	del. 4q35.2 / dup. 5q35.3	5
1	del. 15q11.2	del. 15q.11.2	4
1	dup. 15q11.2	dup. 15q11.2 / dup. 12q24.3	5
1	del. 17p11	del. 17p13.3 / dup. 17q25.3	10
1	dup. 17p11	dup. 17p13.3 / del. 17q25.3	10
1	dup. 22q11.2	dup. 22q11.21 / del 22q13.33	17

Dup.: duplicação; Del.: deleção

Entre os pacientes presentes neste grupo, a maioria apresenta alterações em mais de uma região e até mesmo em outros cromossomos, sendo possível sua detecção utilizando os três kits de MLPA (P064, P036 e P070) em conjunto (Figura 18).

Figura 18 - Imagem representativa das alterações observadas nos pacientes (círculos externos aos cromossomos). O tamanho dos círculos estão proporcionais à quantidade de casos alterados para cada região. Os círculos de cor laranja representam as deleções enquanto que os círculos azuis representam as duplicações. As linhas internas (conectores) estão relacionadas as diferentes alterações em um mesmo paciente. As conexões em vermelho escuro representam pacientes que possuem apenas deleções, os conectores em azul escuro pacientes apenas com duplicações por fim, os conectores verdes pacientes que apresentam tanto deleções quanto duplicações

Alguns desses casos alterados estão descritos abaixo, incluindo a confirmação por outras técnicas moleculares.

4.9. Duplicação da região 5q35.3

Duplicações na região 5q35.3 foram observadas em três pacientes utilizando o kit P064. Em dois casos, a alteração da região 5q35.3 foi observada em duas irmãs, onde apresentavam mais uma cópia do gene *NSD1* (éxons 4, 12 e 17) (Figura 19).

P064

32	SWB_LIMK1	388.3	2
33	SWB_STX1A	288.1	2
34	SaethreC_TWIST1	317.7	2
35	SmithMag_PRPSAP2	325.4	2
36	SmithMag_LLGL1	298.5	2
37	SmithMag_LRRC48	270.7	2
38	SmithMag_MFAP4	351.5	2
39	SmithMag_TACI	162.3	2
40	Sotos_NSD1_ex05	137.9	3
41	Sotos_NSD1_ex13	441.3	3
42	Sotos_NSD1_ex18	208.0	3
43	TWISTNB	199.4	2

P036

1	01p36_TNFRSF18	303.5	2
2	01q44_SH3BP5L	128.3	2
3	02p25_ACP1	311.5	2
4	02q37_ATG4B	135.1	1
5	03p26_CHL1	320.2	2
6	03q29_KIAA0226	141.1	2
7	04p16_PIGG	327.3	2
8	04q35_FRG1	148.3	2
9	05p15_CCDC127	335.4	2
10	05q35_GNB2L1	155.9	3
11	06p25_IRF4	342.4	2
12	06q27_TBP	162.5	2
13	07p22_SUN1	351.3	2

P070

1	01p_TNFRSF4	125.5	2
2	01q_SH3BP5L	302.8	2
3	02p_ACP1	132.6	2
4	02q_CAPN10	310.6	1
5	03p_CHL1	139.7	2
6	03q_BDH	319.1	2
7	04p_PIGG	147.5	2
8	04q_TRIML2	327.2	2
9	05p_PDCD6	155.9	2
10	05q_GNB2L1	334.9	3
11	06p_IRF4	162.7	2
12	06q_PSMB1	341.7	2
13	07n_ADAP1	169.6	2

Figura 19 - Análise dos resultados de MLPA para os pacientes L.A.S e N.A.S.. Ambos os casos (irmãs) apresentavam uma duplicação (x3) na região 5q35.3 e uma segunda alteração na região 2q37.3

Essas alterações puderam, então, ser confirmadas utilizando oligoarrays. Em uma das irmãs (L.A.S.), a duplicação no braço longo do cromossomo 5, compreendia a região 5q35.1-q35.3, com tamanho de 8,5 Mb (172,194,873-180,705,539), envolvendo 102 genes. Já a deleção na região 2q37.3 apresentava tamanho de 3,5 Mb (239,550,182-243,029,573), envolvendo 38 genes na região alterada. Sendo o resultado final do cariótipo molecular arr[hg19] 2q37.3(239,550,182-243,029,573)x1,5q35.1-q35.3(172,194,873-180,705,539)x3.

O tamanho das alterações observadas por esta metodologia foi igual para as duas irmãs (Figura 20), exceto para duas alterações adicionais observadas na paciente N.A.S., onde foi encontrada uma microdeleção em 12p13.31 com tamanho de 136,7 kb (7,986,563-8,123,306) e uma microduplicação em 18q12.1 de 241,6 kb (27,815,609-28,057,171). Sendo o resultado final do cariótipo molecular

arr[hg19] 2q37.3(239,550,182-243,029,573)x1,5q35.1-q35.3(172,194,873-180,705,539)x3,12p13.31(7,986,563-8,123,306)x1,18q12.1(27,815,609-28,057,171)x3.

Figura 20 - Análise molecular pela técnica de SNP-array, onde foi observada uma duplicação (x3) no braço longo do cromossomo 5, 5q35.3 em ambas as irmãs (L.A.S e N.A.S), com tamanho de ~8,5 Mb

As características clínicas para ambas as irmãs foram muito semelhantes, e incluíam a presença de ADNPM e DI, deficiência auditiva, baixa estatura, microcefalia, epicanto, lábios finos, exceto para a paciente N.A.S., que apresentava pescoço curto e ventriculomegalia.

Outro caso de duplicação na região 5q35.3 foi observado no paciente A.O.M.. Semelhante aos dois casos descritos acima, a microduplicação em três éxons (4, 12 e 17) do gene *NSD1* foi detectado utilizando o kit P064 e confirmada pelos kits P036 e P070. No entanto, este caso apresentou uma deleção na porção final do braço longo do cromossomo 4, na região 4q35.2 (*TRIML2*).

Os pontos de quebra das alterações foram obtidas usando a técnica de CGH-array, revelando uma duplicação de ~20,6 Mb na região 5q34-q35.3 (160,148,716-180,712,253), abrangendo aproximadamente 136 genes. A deleção de ~10.8 Mb, localizada em 4q34.3-q35.2 (179,962,284-190,790,881) também foi confirmada por CGH-array. Esta última alteração, localizada na porção final do braço longo do cromossomo 4, compreende uma região com aproximadamente 38 genes. O resultado final do cariótipo molecular foi: arr[hg19] 4q34.3q35.2(179,962,284-190,790,881)x1,5q34q35.3(160,148,716-180,712,253)x3 (Figura 21).

Figura 21 - Resultado da técnica de array-CGH para o caso A.O.M., onde foi possível detectar uma deleção (x1) na região 4qq35.2, e uma duplicação (x3) em 5q34

Neste caso, o paciente apresentava dismorfismos faciais: microcefalia, face alongada, epicanto bilateral, filtro longo, palato alto e lábio superior fino. O

paciente também apresentava baixa estatura e dificuldades de deglutição e em exames complementares, verificou-se uma alteração cardíaca (comunicação intraventricular).

4.10. Duplicação atípica em 22q11.2

As duplicações atípicas em 22q11 estavam presentes em dois pacientes. No primeiro caso, a duplicação foi observada em apenas três sondas representativas dos genes (*ARVCF*, *KLHL22* e *SNAP29*) no kit P064. A duplicação atípica foi confirmada pelo kit P250 e apresentava tamanho aproximado de 1,55 Mb, sendo essa, uma duplicação não flanqueadas por LCRs.

O paciente foi avaliado inicialmente pela neurologia e encaminhado para à equipe de genética do ICr-FMUSP por apresentar além de macrocefalia, surdez, dismorfismos faciais e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Possui cardiopatia congênita (comunicação intraventricular - CIV) e fenda palatina posterior corrigida ao 1 ano e meio de idade. Devido à alta frequência de otite média aguda secretora, o paciente passou por cirurgia apresentando complicações anestésicas.

Os mesmos testes moleculares também foram realizados para os pais do paciente. A mãe não apresentou alterações na região estudada, já o pai apresentou uma duplicação de tamanho menor na mesma região (22q11.2), intercalada com a presença de regiões de número de cópias normais e foi considerada benigna, uma vez que não apresenta fenótipo clínico.

O segundo paciente apresentava fácies típico, microcefalia, pescoço curto e tórax com deformidades, criptorquidia, convulsões e cardiopatia congênita (atresia tricúspide), com duplicação atípica em 22q11 sendo regiões com número de cópias normais intercaladas às sondas deletadas, confirmado pelo kit P250. Os resultados dos kits P036 e P070 revelaram uma duplicação da região

subtelomérica próxima ao centrômero em 22q11, que posteriormente foi visualizado um cromossomo marcador no cariótipo.

4.11. Deleção atípica da síndrome de Williams-Beuren

Em um caso, com o kit P064, foi possível detectar uma microdeleção menor que 1,5 Mb, na região 7q11.23. A deleção atípica em hemizigose envolvia os genes *CYLN2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, preservando o gene *FZD9*, confirmada e delimitada posteriormente pelo kit P029 (específico para a SWB). Esse paciente apresentava um fenótipo que não correspondia em sua totalidade com os aspectos clássicos à SWB, além disso, apresentava outras manifestações fenotípicas, como a agressividade.

Além disso, neste mesmo paciente com SWB foi possível identificar a presença de um cromossomo Y extra com os kits subteloméricos P036 e P070.

Durante o desenvolvimento do projeto, houve a oportunidade de validar os resultados da técnica de MLPA para este paciente por *oligoarray*, onde revelou alterações genômicas complexas que envolvem os cromossomos 7, 13 e X. Em 7q11.23 foram detectadas uma deleção (~115 kb), intercalada a um segmento normal a outra deleção maior (~1,2 Mb) (Figura 22).

Figura 22 - Resultados das técnicas de oligoarray e MLPA, onde foi possível detectar uma deleção atípica envolvendo a região crítica para a SWB. As setas mostras as regiões sem alterações intercaladas às deleções em 7q11.23

Ainda, foi detectada uma duplicação em 7p14.3 de aproximadamente 505 kb e em 13q31.3 uma deleção de ~300 kb. Nos cromossomos sexuais foram encontradas duas duplicações, sendo a alteração em Xp22.3 também intercalada por sequências normais (~335 kb e ~1,3 Mb) e outra em Xq28 (~330 kb), revelando um rearranjo complexo (Figura 22) (Dutra et al., 2014). Os pais realizaram os testes moleculares para MLPA e não apresentaram alterações nas regiões estudadas.

4.12. Síndrome de deleção 1p36

O kit P064 permitiu a identificação de alterações em outras regiões susceptíveis a rearranjos, como as microdeleções em 1p36.

Alterações na dosagem gênica para esta região foram observadas em três pacientes pela técnica de MLPA. Entre esses casos, apenas um paciente apresentava deleção típica das sondas para a região crítica de 1p36. A paciente apresentava atraso de desenvolvimento, convulsões desde um ano de idade, fácies típico para a síndrome de deleção 1p36, atraso de fala, surdez neurossensorial e hipotireoidismo. Os pais apresentaram resultado de MLPA sem alterações.

Com este kit foi possível também identificar uma deleção atípica em 1p36, no qual o paciente apresentava apenas uma sonda normal das sete sondas presentes no kit. O bandamento G mostrou um cariótipo normal e a investigação pela técnica de MLPA com diferentes kits (P036 e P070), revelou uma deleção subtelomérica atípica em 1p36 que inclui os genes *TNFRSF4* e *TNFRSF18*, conservando o gene *TP73* (Figura 23a).

A paciente apresentava fácies típico, microsomia, hipertricose, hipotonia global, hipotireoidismo congênito e convulsões, além de surdez neurossensorial e estenose pulmonar esquerda.

A técnica de *oligoarray* detectou alterações complexas em 1p36 que incluem regiões normais intercaladas com regiões deletadas e duplicadas (deleção ~1,9 Mb / normal / deleção ~970 kb / normal / duplicação ~168 kb). Sendo o resultado final do cariótipo molecular: arr[hg19] 1p36.3(564,620-2,456,203)x1,1p36.3(2,473,257-3,446,813)x1,1p36.3(3,474,630-3,641,681)x3 (Figura 23b e 23c). Assim, a delineação molecular nesse caso revelou uma duplicação rara em um paciente com clínica aparentemente compatível com a síndrome de 1p36 evidenciando a necessidade da utilização da citogenômica para aperfeiçoar o diagnóstico clínico.

Figura 23 - Resultados das técnicas de a) MLPA, onde foi possível detectar uma deleção atípica para a região de 1p36 e b) SNP-array que permitiu confirmar a alteração atípica. C) pontos quebra de todas as regiões presentes no rearranjo complexo. Adaptado de Zanardo et al., 2014

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a técnica de MLPA foi realizada para o diagnóstico molecular em 416 pacientes com malformações congênitas associados ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou DI.

Para esses pacientes, a análise pela técnica de MLPA utilizando os kits P064, P036 e P070, permitiu detectar microdeleções e/ou microduplicações em 97/ 416 pacientes (23,3%).

Segundo a literatura, a detecção de alterações cromossômicas por cariotipagem clássica em pacientes com anomalias congênitas e DI, pode chegar à 5% dos casos (Van Karnebeek et al., 2005). Com o avanço das técnicas moleculares, essa taxa de detecção pode chegar a aproximadamente 20% dos casos (Hochstenbach et al., 2009).

Essa variação de taxa de detecção pode ocorrer devido a diversos fatores, tais como o tipo de plataforma de análise, a cobertura genômica, densidade das sondas e principalmente a combinação de sondas presentes nos testes de diagnóstico molecular (Stefansson et al., 2008; Schaaf et al., 2011).

Para a técnica de MLPA em específico, a taxa de detecção de CNVs para pacientes com AC e ADMPM / DI pode variar entre 9 e 30% (Jehee et al., 2011; Boggula, et al., 2014) dependendo da combinação dos kits de MLPA e triagem prévia dos pacientes.

Jehee e colaboradores (2011), utilizando esta mesma combinação de kits de MLPA (P064, P036 e P070) para 261 pacientes, observaram alterações no número de cópias genômicas em 31,8% dos casos. No entanto, as CNVs que foram consideradas causativas, ou seja, possuíam associação com o fenótipo clínico do paciente, estavam presentes em 57 pacientes, representando assim uma taxa de 21,8% dos casos.

Os resultados obtidos pelo presente estudo foram muito semelhantes aqueles encontrados por Jehee et al., 2011, possibilitando a identificação de

alterações genômicas em 23,3%. Além do mais, essa taxa de detecção pode ser considerada elevada, quando comparado aos outros trabalhos da literatura (Pohovski et al., 2013; Boggula, et al., 2014).

Em um trabalho recente desenvolvido na Índia, foram analisados pela técnica de MLPA 203 pacientes que apresentavam ADMPM / DI com ou sem malformações congênitas. Utilizando um conjunto de kits de MLPA para as principais síndromes de microdeleções, regiões subteloméricas e específico para o cromossomo X, foram encontrados resultados alterados em 9,3% dos pacientes (Boggula, et al., 2014).

O aumento da taxa de detecção de CNVs observada em nossa casuística pode ter ocorrido devido à realização de uma triagem clínica e até mesmo molecular, ou seja, pacientes com algumas características fenotípicas em comum poderiam ser direcionados a um teste molecular específico (Schaaf et al., 2011). Assim, o MLPA pode ser considerado uma técnica molecular eficiente de triagem para a detecção de microdeleções / microduplicações.

5.1. Investigação de CNVs *de novo* e herdadas

No presente estudo, as alterações genômicas ocorreram por mutações *de novo* em 59/97 pacientes (60,8%) e herdado de um dos genitores em oito casos (8,2%). Pela descrição clínica, esses pais foram considerados aparentemente normais, ou seja, assintomáticos.

Entre os oito pacientes em que as alterações foram herdadas de um dos genitores, em dois casos as alterações ocorreram na região crítica para a síndrome de deleção de 22q11.2.

Embora na maioria dos casos, a síndrome de deleção em 22q11.2 ocorra de forma esporádica, o padrão de herança autossômico dominante pode ocorrer em alguns pacientes, ou seja, os pais portadores da deleção em 22q11.2

possuem 50% de chance de passar a mesma alteração para a prole (Thompson e Davies, 1998).

Em um dos casos presentes no estudo, a deleção em 22q11.2 foi herdada a partir de um dos pais que apresentavam alterações fenotípicas semelhantes às encontradas no probando.

Outro ponto importante no padrão de herança envolvido na deleção em 22q11.2 está associado aos pais que possuem alteração na região crítica para a síndrome, mas que não apresentam fenótipo. Na literatura, essa frequência de pais com CNVs patogênicas e assintomáticos está em torno de 8% a 28% (Digilio et al., 1997; Kobrynski and Sullivan, 2007).

Para o caso B.M., foi possível observar este padrão de herança em três gerações da família do probando. O paciente apresentava deleção de ~500 kb com características clínicas para a síndrome de deleção de 22q11.2, a mãe apresentava deleção na mesma região de ~640 kb, apresentando apenas distúrbios emocionais (depressão), enquanto que o avô materno apresentava uma deleção de ~1,0 Mb na mesma região, sendo assintomático.

As deleções atípicas presentes nesta família foram detectadas utilizando os kits P064 e P250 e, confirmadas posteriormente, pela técnica de *oligoarray* para delinear com maior precisão os pontos de quebra das alterações.

Com estes resultados, foi possível sugerir a etiologia e os possíveis mecanismos de rearranjos presentes nessas alterações. Considerando as alterações tanto no probando quanto na mãe, onde ambas as CNVs ocorreram em regiões de sequências repetitivas, pode ser sugerido o mecanismo de NHAR.

Já para a síndrome de deleção de 7q11.23, os casos familiares são ainda mais raros, ocorrendo em menos de 5% dos afetados com a síndrome (Cortada et al., 1980; Morris et al., 1993; Pankau et al., 2001).

No entanto, para o paciente A.P.B.M. a deleção na região 7q11.23 foi transmitida por um dos genitores. A mãe que transmitiu a deleção de 1,5 Mb para o probando também apresentava características fenotípicas compatíveis com a SWB.

Em um dos casos presentes no estudo, a deleção em 22q112 foi herdada a partir de um dos pais que apresentavam alterações fenotípicas semelhantes às encontradas no probando.

Para outro paciente com a síndrome de deleção de 7q11.23 (SWB), foi observado uma deleção em hemizigose da sonda POLR3K na região 16p13.3 apenas para o kit P036. Os testes moleculares realizados na mãe assintomática revelaram também uma deleção na região 16p13.3, sendo a mesma alteração encontrada no filho.

Segundo Jehee e colaboradores (2011) essas alterações observadas tanto nos probandos quanto nos genitores saudáveis podem estar associados à penetrância incompleta ou mecanismos de *imprinting*, e talvez não estejam relacionadas às alterações causativas.

A investigação mais detalhada das alterações cromossômicas associadas ao fenótipo sempre foi muito complexa, devido à grande variabilidade clínica dos pacientes. Essa expressividade variável ocorre dentro de um espectro fenotípico, como nos casos de atraso no desenvolvimento, DI, aspectos dismórficos e/ou outras alterações congênitas, dificultando assim, a associação genótipo-fenótipo (Berg et al., 2010).

Outro desafio consiste no estudo das alterações com significado clínico incerto, as VOUS. Em 2009, estudando 13.926 pacientes com DI e anomalias congênitas com rearranjos genômicos detectados por CGH-array, Sagoo e colaboradores observaram que as CNVs herdadas de pais não afetados, foram considerados resultados falso-positivos, presente em 7% dos casos.

No entanto, os autores sugerem que as CNVs patogênicas podem ter baixa penetrância nos pais saudáveis, levando a fenótipos cognitivos e comportamentais muitos leves, que podem passar despercebidos, considerando que na maioria dos centros apenas a criança afetada seja o alvo da consulta (Schaaf et al., 2011).

Em 30/97 casos (31,0%), não foi possível a coleta de amostras de sangue de um dos genitores para o estudo molecular. Por se tratar de um hospital infantil de referência, o ICr atende pacientes de todos os estados brasileiros. Por

isso, alguns pais não conseguem trazer os filhos pessoalmente para o tratamento, dificultando assim a investigação em ambos os pais.

5.2. Investigação das principais síndromes de microdeleções

Alterações encontradas apenas pelo kit P064 para as principais síndromes de microdeleções, foram observadas em 46/416 pacientes (11,1%), constituído principalmente por 26 pacientes com alterações na região 22q11.2 e 20 pacientes com deleção intersticial na região 7q11.23.

A detecção dessas alterações tem sido observada em outros trabalhos da literatura com frequência semelhante ao que foi encontrado no presente estudo. Em 2006, Kirchhoff e colaboradores, utilizando o kit P064 para o diagnóstico molecular de 258 pacientes, encontraram alterações genômicas em aproximadamente 6% dos casos.

Jehee e colaboradores, em 2011, verificaram que as alterações para as principais síndromes de microdeleção e microduplicação foram observadas em aproximadamente 10% dos 261 pacientes com múltiplas anomalias congênitas associada à DI.

Neste mesmo estudo, a presença de alterações em 22q11.2 foi mais evidente, representando aproximadamente 20% de todas as CNVs observadas. Já em nosso estudo, a presença de alterações apenas na região 22q11.2 foi encontrada com maior frequência (26,8%), presente em 26 pacientes entre todos os alterados.

Alterações na região 7q11.23 também foram observadas com frequência alta (20/97 pacientes), representando 20,6% da nossa casuística de pacientes afetados. A frequência alta de pacientes com essas alterações pode ser explicada pela linha de pesquisa já existente no grupo de Genética do ICr.

5.3. Síndrome de deleção 22q11 (DiGeorge / Velocardiofacial)

Entre as principais anormalidades detectadas pelo kit P064, as microdeleções na região 22q11.23 (Síndrome de DiGeorge / Velocardiofacial – SDG / SVCF) estavam presentes em 23/60 pacientes (38,3%).

A redução no número de cópias na região 22q11.2 (Síndrome de DiGeorge / Velocardiofacial / CATH22) é a síndrome de microdeleção mais frequente, presente entre 1 a 4.000 nascidos-vivos (Devriendt et al., 1998; Monteiro et al., 2007).

Entre os 26 pacientes com CNVs no cromossomo 22, apresentaram deleções na região crítica, envolvendo as LCR22-A à LCR22-D e tamanho aproximado de 3 Mb. Todos os pacientes com deleção nesta região apresentavam: malformações 23 delas cardíacas, incluindo tetralogia de Fallot ou comunicação intraventricular; dismorfismos faciais e infecções de repetição. Alguns pacientes apresentavam ainda, fenda palatina e crises convulsivas.

Na literatura, cerca de 90% dos casos com síndrome de deleção de 22q11.2 apresentam microdeleções com tamanho de 3 Mb, envolvendo aproximadamente 40 genes. No restante dos casos (~10%), a deleção na região 22q11.2 possui tamanho aproximado de 1,5 Mb, reduzindo o número de cópias de aproximadamente 30 genes (Edelmann et al., 1999; Shaikh et al., 2000; Jones and Gawronski, 2002; Gao et al., 2013).

Inseridos neste grupo de deleções menos frequentes em 22q11.2 estavam dois pacientes, onde apresentavam uma microdeleção de 1,5Mb para a região crítica, detectada pelos kits P064 e P250. Interessantemente, ambos os kits permitiram a detecção de uma deleção de tamanho menor, do que aquela encontrada comumente nos pacientes com suspeita da síndrome de deleção de 22q11.2.

Nos dois pacientes, as alterações clínicas foram muito semelhantes, exceto para um dos casos, em que o paciente (F.D.M.) apresentava malformação

cardíaca (tetralogia de Fallot). Para este caso específico, outras técnicas moleculares de maior cobertura poderiam ser empregadas para delinear melhor a alteração genômica na região 22q11.2.

5.4. Síndrome de deleção 7q11.2 (Williams-Beuren)

Utilizando o kit P064, foi possível detectar alterações na região crítica para a SWB (7q11.23) em 19/60 pacientes (31,7%), confirmando por testes moleculares o diagnóstico clínico da SWB.

A alta frequência de detecção de microdeleções em 7q11.23, pode ser também explicada pela linha de pesquisa já existente no grupo de Genética do ICr.

Em trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo, a técnica de MLPA se mostrou muito eficiente na confirmação do diagnóstico para a SWB quando comparado a outras técnicas moleculares (Dutra et al., 2012a).

Ainda, em relação ao diagnóstico da SWB, a técnica de MLPA também possui importante papel na detecção de alterações atípicas, onde Honjo e colaboradores (2012) observaram pelo MLPA, uma deleção atípica de aproximadamente 250 kb na região 7q11.23, compreendendo os genes *ELN* (éxon 33), *LIMK1* e *EIF4H*.

5.5. Microduplicação na região 7q11.2

No presente estudo, apenas um paciente apresentou duplicação em 7q11.23 e em apenas uma sonda, para o gene *FZD9*. Os resultados obtidos pela técnica de MLPA não foram concordantes com o obtido por SNP array, onde se observou apenas uma pequena deleção em 18p11.21 com tamanho de 273 kb.

A duplicação em 7q11.23 obtido apenas pela MLPA, pode ter ocorrido devido a alta especificidade da técnica. Alterações no genoma de poucos pares de bases favorecem a hibridação da sonda *FZD9*.

O fenótipo observado nos pacientes com duplicações em 7q11.23 tem emergido recentemente e o amplo espectro clínico ainda precisa ser bem delineado. No entanto, é evidente que as duplicações geram aspectos clínicos mais leves e aspectos faciais menos distintos daqueles pacientes com características clínicas típicas na SWB (Depienne et al., 2007; Torniero et al., 2008; Merla et al., 2010). Neste caso, o paciente com a duplicação da sonda *FZD9* apresentava fâcies semelhantes aos indivíduos com alterações em 7q11.23 e alta sociabilidade.

Outras características clínicas presentes neste paciente incluem: surdez neurossensorial bilateral; coloboma de papila bilateral e infecções de repetição.

Na literatura, deleções no braço curto do cromossomo 18 estão entre as alterações cromossômicas mais comuns (Wester et al., 2005). No entanto, não há trabalhos associados à microdeleções especificamente no gene *ANKRD30B*, além de não apresentar deleções do tamanho de 273,6 kb para a região 18p11.21 no DGV. Esse é um caso interessante de CNVs que possuem significado incerto atualmente considerado VOUS.

5.6. Detecção de outras alterações genômicas utilizando o kit P250

Algumas alterações detectadas pela técnica de MLPA só foram observadas utilizando kits específicos, como no caso do kit P250. Este kit, além de possuir mais de 40 sondas para a região de 22q11.2, também é capaz de detectar alterações em outros cromossomos associados às alterações cardíacas.

Ainda nas alterações em 22q11.2, identificamos alterações genômicas patogênicas em 30/54 pacientes (55.6%) utilizando kit de MLPA específico P250 (Dutra et al., 2012b).

Para dois pacientes que apresentavam características clínicas compatíveis com a síndrome de deleção de 22q11.2, só foi possível identificar a deleção em 8p23.1 quando utilizado o kit específico. Nos casos onde a suspeita clínica era compatível com alterações em 22q11.2, o direcionamento dos pacientes para kits específicos foi de grande importância na detecção de CNVs patogênicas.

O mesmo ocorreu para os outros dois casos, que apresentaram uma duplicação nos genes (*TOP3B* e *HIRA*) na região 22q11.2. Por essas sondas específicas não estarem presentes nos kits de MLPA para as principais microdeleções (P064), só foi possível identificar essas alterações pelo kit P250.

Assim, alguns pacientes com quadro clínico sugestivo de síndrome de deleção de 22q11.1, embora pudessem ser direcionados para kits de MLPA com maior abrangência (P064), necessitam de triagem por kits específicos, sendo importante no diagnóstico molecular de cardiopatias complexas.

5.7. Investigação das alterações subteloméricas (kits P036 e P070)

No nosso trabalho foi possível detectar alterações subteloméricas em 47/416 pacientes (11,3%) utilizando apenas os kits P036 e P070, sendo essa frequência semelhante à literatura (Ledbetter e Martin, 2007; Rodriguez et al., 2008).

Os rearranjos subteloméricos são responsáveis por uma alta proporção das anormalidades citogenéticas (Shao et al., 2008). Em estudo com 2500 pacientes com DI, 4,8% dos casos possuíam deleção ou duplicação em regiões subteloméricas (de Vries et al., 2003).

Uma investigação realizada com 11.688 casos não selecionados encontrou uma taxa de desequilíbrio subtelomérico de 3,0%, sendo que esta taxa foi reduzida para 2,6% quando considerados apenas as alterações patogênicas (Ravnan et al., 2006). Estudos posteriores também mostraram resultados significativos, onde foi encontrada uma taxa de 4,4% de desequilíbrio subtelomérico patogênico em uma amostra de 5.380 casos (Shao et al., 2008) e uma taxa de 2,4% de uma investigação de aproximadamente 7.000 casos (Ballif et al., 2007).

É interessante notar que, em nosso trabalho, seis pacientes apresentavam alterações pelo kit P036, dois pacientes pelo kit P070 e 26 pacientes em ambos os kits. Se usássemos apenas um dos kits, deixaríamos de diagnosticar de sete a nove dos 40 pacientes, reforçando a necessidade da utilização de dois kits diferentes.

O fato das sondas de MLPA variarem de apenas 50 – 70 nt de extensão e serem elas próprias amplificadas por PCR, e não os próprios genes, reflete na análise dos dados gerados e na identificação de alterações.

Da mesma forma, caso haja uma diferença de apenas um nucleotídeo na região alvo da sonda, não haverá hibridação. Portanto, há também a possibilidade que a deleção observada na análise dos dados seja menor do que a que realmente existe, ou que esta alteração não seja sequer uma deleção, mas uma inserção de uma ou mais bases, mutações pontuais entre outras. Entretanto, estas alterações podem acarretar numa perda de função do gene, gerando uma patogenicidade.

Por esse motivo, em determinados casos, não podemos afirmar que a alteração encontrada seja responsável, sozinha, por todas as características fenotípicas encontradas.

Com isso, a maioria dos trabalhos na literatura utilizam os dois kits subteloméricos em conjunto para detecção de CNVs (Christofolini et al., 2010; Jehee, et al., 2011, John, et al., 2013; Pohovski et al., 2013; Boggula et al., 2014; Medina et al., 2014).

Em 2010, Christofolini e colaboradores, utilizando a técnica de MLPA (P036 e P070), encontraram alterações no número de cópias genômicas de regiões subteloméricas em 7,6% dos pacientes com DI. Jehee e colaboradores (2011) também observaram frequência semelhante por ambos os kits subteloméricos, representando 7,3% dos pacientes com AC e ADNPM / DI.

Recentemente, Medina e colaboradores (2014) identificaram alterações subteloméricas em 5/119 pacientes (4,2%) que apresentavam DI idiopática.

Assim, as taxas de detecção de CNVs patogênicas nos trabalhos citados podem ocorrer com frequência entre 3 e 6% em pacientes com DI isolada. No entanto, esses valores de detecção podem ultrapassar 10% quando associados às anomalias congênitas (Ledbetter e Martin, 2007; Rodriguez et al., 2008), sendo isso verificado em nosso estudo (11,3%).

5.8. Tipos de alterações genômicas encontradas pelos kits P036 e P070

Entre os pacientes que apresentavam CNVs nas regiões subteloméricas, alterações nas porções finais do cromossomo 4 foram observadas em nove pacientes. Desses, cinco apresentavam alterações na região terminal de 4p.

As deleções em 4p16 (Síndrome de Wolf–Hirschhorn) ocorrem em uma frequência aproximada de 1 para cada 50.000 nascidos vivos e na maioria dos casos as alterações são de novo com tamanho de 5,0 Mb (Battaglia et al., 2001). As deleções maiores também estão presentes nos casos com SWH, estendendo até a região 4p14.

O mecanismo de origem dessas deleções *de novo* ainda não é bem claro. Alguns trabalhos na literatura sugerem que as regiões subteloméricas sejam mais favoráveis aos rearranjos cromossômicos, provavelmente por necessitar

apenas de um ponto de quebra, diferentemente das síndromes de deleções intersticiais (Bergemann et al., 2005).

Além disso, a alta variabilidade no tamanho das deleções na região 4p16 pode levar a um amplo espectro fenotípico para a SWH. Embora mais da metade dos casos sejam diagnosticados pela técnica de citogenética convencional (banda G), algumas deleções são observadas apenas por técnicas moleculares mais acuradas, deixando assim diversos casos sem diagnóstico para a síndrome (Sifakis et al., 2012).

As alterações em 4p16 também podem vir acompanhadas de outras alterações genômicas, assim como foi observado em um paciente da casuística, onde foi detectado também uma duplicação em 8p23.3, por ambos os kits P036 e P070.

Além deste caso, onde foram observadas alterações nas porções finais dos cromossomos para diferentes regiões, outros pacientes da nossa casuística também tiveram duas alterações em regiões distintas, detectadas pelos kits subteloméricos.

A utilização da técnica de *oligoarray* para esses casos foi de extrema importância na conclusão diagnóstica. Com o tamanho exato das CNVs observadas, foi possível comparar a clínica do paciente com o fenótipo encontrado por outros grupos de pesquisa.

Por exemplo, em um dos pacientes foi detectado uma deleção em 9p24.3 - p24.2 de aproximadamente 4,17 Mb e uma duplicação em 18q12.3 - q23 de 38,88 Mb por ambas as técnicas moleculares (MLPA e *oligoarray*). Ao comparar essas alterações com outros casos disponíveis nos bancos de dados (DECIPHER), as características fenotípicas não se encaixavam em apenas uma CNV, e sim apresentavam uma sobreposição de achados clínicos.

Assim, a presença de um amplo espectro fenotípico nos pacientes com AC e ADNPM dificulta cada vez mais a associação genótipo-fenótipo e a sobreposição de fenótipos faz com que a implantação de testes de diagnóstico moleculares seja uma necessidade na identificação etiológica das doenças genômicas.

5.9. Alterações encontradas pelos kits P064, P036 e P070 em conjunto

Entre os casos presentes neste estudo, 13 pacientes apresentavam deleções ou duplicações pelo kit P064 juntamente com os kits P036 e P070.

Em alguns desses casos, as alterações observadas pelos três kits foram importantes na confirmação dos resultados. Por exemplo, nos casos de deleção terminal do braço longo do cromossomo 1, onde há sondas para a região 1p36 presentes nos três kits de MLPA utilizados.

Isso pode ser verificado também em trabalhos na literatura, onde diversos autores utilizaram uma combinação de kits de MLPA para confirmar os resultados alterados (Kirchhoff et al., 2006; Jehee et al., 2011; Pohovski et al., 2013; Boggula et al., 2014).

Essa confirmação de resultados utilizando os kits de MLPA para as principais síndromes de microdeleções (P064) e os kit subteloméricos (P036 e P070) também possibilitou identificar alterações em outras regiões como em 5q35.3; 7p21.1; 15q11.2; 22q11.2.

A presença de algumas alterações genômicas, como a presença de malformações cardíacas ou convulsões, foram observadas na maioria dos pacientes com alterações em pelo menos um dos kits de MLPA.

Além disso, a detecção de diferentes CNVs utilizando o mesmo conjunto de kits de MLPA revelou uma série de pacientes que apresentaram possíveis rearranjos complexos.

5.10. Rearranjos complexos

No presente estudo foram observados rearranjos complexos em sete casos, sendo que em quatro pacientes com alterações pelo kit P064 associado a outras alterações pelos kits P036 e P070.

Em outros três casos, as alterações encontradas nas regiões 22q11.2, 1p36 e 7q11.23, foram consideradas rearranjos complexos pelo kit P064, já que nesses casos, havia sequências genômicas com número de cópias normais intercaladas em sequências alteradas. Em dois desses pacientes (1p36 e 7q11.23) foi realizado também a técnica de *oligoarray*, confirmando os dados obtidos por MLPA.

Outros mecanismos moleculares também estão envolvidos na formação dos rearranjos complexos, entre eles estão: união de extremidades não homólogas (NHEJ – *non-homologous end joining*); replicação induzida pela quebra de DNA por homologia (MMBIR - *microhomology-mediated break induced replication*); atraso da forquilha de replicação e mudança de molde de DNA (FoSTeS - *fork stalling and template switching*) e retrotransposição (Gu et al., 2008; Carvalho et al., 2009)

O mecanismo NHEJ é uma das principais vias de reparo das quebras de DNA dupla fita. Após a detecção da quebra do DNA, este mecanismo repara as duas fitas sem a necessidade de uma homologia nas pontas, removendo e inserindo novos nucleotídeos sem a restauração necessária das sequências ao redor do dano (Weterings e van Gent, 2004)

Já o mecanismo de FoSTeS ocorre durante o processo de replicação do DNA, no qual a forquilha de replicação é bloqueada devido a um erro em uma das fitas simples de DNA. Para corrigir este erro, são requeridas sequências de DNA localizadas em outra forquilha próxima ao erro e que apresentam microhomologia para servir como molde de reparo. Na tentativa de corrigir o erro, este mecanismo pode gerar rearranjos complexos com sequências duplicadas,

deletadas e invertidas em um mesmo fragmento (Carvalho et al., 2009; Liu et al., 2011).

O MMBIR é um mecanismo também associado à forquilha de replicação. No entanto, quando é encontrado um erro na fita molde, a forquilha de replicação entra em colapso e sequências de micro-homologia serão utilizadas como molde para a formação de uma nova fita (Hastings et al., 2009).

Na literatura, o entendimento sobre a formação de rearranjos complexos ainda é muito contraditória. Alguns trabalhos descrevem que os danos aos cromossomos podem ocorrer após várias tentativas fracassadas do processo de replicação como mencionada acima (Stephens et al., 2011).

No entanto, Liu e colaboradores (2011) verificaram que alguns cromossomos apresentavam rearranjos condizentes com o processo de *chromotripsis* (catástrofe cromossômica). Neste mesmo trabalho, através de uma combinação de técnicas moleculares, foi possível ter um perfil detalhado da presença de CNV, sua posição e orientação das sequências envolvidas em rearranjos complexos de pacientes com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e anomalias congênitas.

Mais recentemente, Crasta e col. (2012) sugeriram que o processo de formação da *chromotripsis* poderia ser mediado pela formação de micronúcleos, consequentemente levando a instabilidade genômica.

Assim sabemos que anormalidades na arquitetura genômica, levando à instabilidade genômica, podem gerar diferentes manifestações clínicas como as AC e ADNPM. No entanto, o diagnóstico dessas anormalidades nem sempre é possível e a identificação de biomarcadores, crítica para a elucidação clara desses diagnósticos ainda apresenta muitas dificuldades (Shaffer & Lupski, 2000).

Outros cinco casos ainda estão em análise. Na literatura, Girirajan e colaboradores (2011) propuseram que a presença de duas alterações no número de cópias gênicas em locais diferentes pode estar associada ao aumento da gravidade do atraso de desenvolvimento nos pacientes afetados.

5.11. Considerações sobre a técnica de oligoarray

Alcançar um diagnóstico etiológico é fundamental para entender a natureza da doença, fornecendo respostas sobre o prognóstico, os riscos de recorrência e direcionando o paciente à terapia específica, o que pode minimizar o custo financeiro dessas doenças e até mesmo possibilitar a inclusão desses indivíduos na sociedade (Galasso et al., 2010).

Em 2007 a comunidade europeia indicava que o cariótipo molecular seria mais eficiente do que o cariótipo convencional na genética clínica (Vermeesch et al., 2004; Gijsbers et al., 2009).

Em junho de 2008, o “*First International Workshop on a Uniform Cytogenetic Array and Shared Database*” em Atlanta, nos Estados Unidos, recomendou que a análise citogenética por CGH-array deveria substituir o cariótipo convencional como primeiro teste de investigação em pacientes com malformações congênitas. No mês seguinte, a Sociedade de Laboratórios de Citogenética Clínica do Canadá adotou a mesma postura.

Recentemente, o Brasil passou por modificações em suas políticas na área de genética. Em dezembro de 2008, o Diário Oficial da União publicava portaria do Ministério da Saúde com as primeiras diretrizes políticas de genética clínica do SUS, incluindo exames e aconselhamento genéticos na rede de saúde a partir de 2009.

Em trabalho publicado por Jehee e colaboradores (2011), o custo do MLPA apresentou valor quase cinco vezes menor quando comparado com a técnica de oligoarray, mesmo utilizando um conjunto de três kits para o diagnóstico de AC e DI. Em valores em 2011 a MLPA apresentava um custo aproximado de US\$ 235,67, enquanto que para as técnicas de oligoarray seria de US\$ 1141,88.

A reavaliação de pacientes com algumas destas síndromes através das plataformas de oligoarrays de DNA levaram a melhor caracterização dos

segmentos genômicos envolvidos e resolução precisa dos pontos de quebra das alterações cromossômicas, permitindo uma melhor definição dos estudos de genótipo-fenótipo e identificação de genes candidatos para algumas afecções (Hochstenbach et al., 2009).

Além disto, a utilização de diagnóstico genômico por *oligoarray* em pacientes sem suspeita clínica definida revelou uma enorme variabilidade fenotípica e ampliou o leque clínico das síndromes já conhecidas. Diversos pacientes com sinais atípicos possuem a mesma microdeleção ou microduplicação de síndromes conhecidas. Este dado amplia o espectro clínico de diversas patologias e por vezes dificulta o diagnóstico das mesmas, permitindo melhor acompanhamento clínico dos pacientes e realização de aconselhamento genético para as famílias (Mosca-Boidron et al., 2012).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A técnica de MLPA foi eficiente em diagnosticar 97/416 (23,3%). O uso do kit P064 possibilitou diagnóstico molecular em 46 pacientes, principalmente nas deleções 22q11.2 em 26 pacientes e 20 pacientes com SWB tanto em deleções típicas quanto atípicas.
- O uso dos kits P036 e P070 para as regiões subteloméricas possibilitaram a detecção de alterações em 34 pacientes e observamos a necessidade da utilização de ambos os kits.
- A técnica de MLPA com kits combinados, por possuir maior abrangência de regiões detectadas e menor custo, é uma ferramenta valiosa para ser utilizada como um teste de triagem molecular.
- Os pacientes atendidos no Instituto da Criança e suas famílias, foram beneficiados na investigação diagnóstica por meio da implementação da metodologia de MLPA com três kits combinados, ainda não disponíveis nos serviços de rotina do sistema de saúde.

ANEXO A

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GENITORES)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Investigação etiológica da variação no número de cópias de pacientes com anomalias congênitas pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).**”

PESQUISADORA: **Dra. Chong Ae Kim**

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **40054**

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**

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

1 – Este projeto de pesquisa é importante para ajudar a definir o diagnóstico da doença do seu filho(a) que possui atraso no desenvolvimento e/ou malformações. Em algumas doenças genéticas, como no caso do seu filho, o diagnóstico só é possível com exames mais complexos que procuram pequenas alterações de ganho ou de perda de material genético para explicar a doença de seu filho(a). Assim, seu filho ao participar deste projeto, usando nova técnica de exame possibilitará seu esclarecimento diagnóstico ajudando a prevenir possíveis casos nas irmandades e seus familiares. Para saber se esta alteração vem de família, convidamos você (pai ou mãe) para também realizar este estudo.

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

3 – Será colhida uma amostra 5 mL de sangue da veia do braço que é suficiente para diferentes exames de sangue relacionados a essa pesquisa. No caso de algum dos exames apresentar um resultado alterado, solicitaremos aos pais que retornem para explicação do resultado e para discutir se será necessário ou não uma investigação adicional com novos exames da criança e possivelmente dos pais. Em alguns casos outros familiares, como por exemplo, os avós ou irmãos, também poderão fazer parte do estudo para estabelecimento do diagnóstico e conclusão do padrão de hereditariedade que possibilitará a realização do aconselhamento genético de forma acurada. Guardaremos uma amostra do material genético para sempre que possível procurar mais alterações neste material, o que poderia explicar a doença.

4 – O desconforto associado ao exame de sangue consiste apenas daquele relacionado à coleta. Punção Venosa: após punção venosa (“tirar sangue”) o local pode ficar um pouco

dolorido. Também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma (“roxo”) que pode persistir por alguns dias; porém o mesmo se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Investigação etiológica da variação no número de cópias de pacientes com anomalias congênitas pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)”.

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

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO B

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Investigação etiológica da variação no número de cópias de pacientes com anomalias congênitas pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).”**

PESQUISADORA: **Dra. Chong Ae Kim**

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **40054**

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**

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

1 – Este projeto de pesquisa é importante para ajudar a definir o diagnóstico da doença do seu filho(a) que possui atraso no desenvolvimento e/ou malformações. Em algumas doenças genéticas, como no caso do seu filho, o diagnóstico só é possível com exames mais complexos que procuram pequenas alterações de ganho ou de perda de material genético para explicar a doença de seu filho(a). Assim, seu filho ao participar deste projeto, usando nova técnica de exame possibilitará seu esclarecimento diagnóstico ajudando a prevenir possíveis casos nas irmandades e seus familiares.

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

3 – Será colhida uma amostra 5 mL de sangue da veia do braço que é suficiente para diferentes exames de sangue relacionados a essa pesquisa. No caso de algum dos exames apresentar um resultado alterado, solicitaremos aos pais que retornem para explicação do resultado e para discutir se será necessário ou não uma investigação adicional com novos exames da criança e possivelmente dos pais. Em alguns casos outros familiares, como por exemplo, os avós ou irmãos, também poderão fazer parte do estudo para estabelecimento do diagnóstico e conclusão do padrão de hereditariedade que possibilitará a realização do aconselhamento genético de forma acurada. Guardaremos uma amostra do material genético para sempre que possível procurar mais alterações neste material, o que poderia explicar a doença.

4 – O desconforto associado ao exame de sangue consiste apenas daquele relacionado à coleta. Punção Venosa: após punção venosa (“tirar sangue”) o local pode ficar um pouco dolorido. Também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma (“roxo”) que pode

persistir por alguns dias; porém o mesmo se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Investigação etiológica da variação no número de cópias de pacientes com anomalias congênitas pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)”.

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

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO C

949

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 07/06/2011, **APROVOU ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **0282/11**, intitulado: **"INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DA VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS EM PACIENTES COM ANOMALIAS CONGÊNITAS PELA TÉCNICA DE MLPA (MULTIPLEX LIGATION PROBE-DEPENDENT AMPLIFICATION)"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Chong Ae Kim**

Pesquisador (a) Executante: **Roberta Lelis Dutra**

Co-autores: **Leslie Domenici Kulikowski**

CAPPesq, 07 de junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO

Coordenador

**Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO D

Sondas presentes em cada kit de MLPA (P036, P064, P070, P029 e P250) com a exata posição genômica

Kit de MLPA	Genes	Exon	Posição cromossômica	Início	Fim
P064	<i>ACTRT2</i>	1	01p36.32	2928350	2928410
P064	<i>PEX10</i>	2	01p36.32	2331696	2331754
P036	<i>TNFRSF4</i>	5	01p36.33	1137299	1137363
P064	<i>GABRD</i>	6	01p36.33	1949449	1949511
P064	<i>TNFRSF4</i>	3	01p36.33	1138225	1138276
P070	<i>TNFRSF18</i>	4	01p36.33	1129414	1129484
P036	<i>SH3BP5L</i>	5	01q44	247075309	247075380
P070	<i>SH3BP5L</i>	3	01q44	247077648	247077710
P029	<i>RTN4</i>	8	02p16.1	55068269	55068339
P029	<i>MSH6</i>	5	02p16.3	47884239	47884306
P070	<i>ACP1_ex.5</i>	5	02p25.3	267097	267173
P036	<i>CAPN10</i>	3	02q37.3	241178951	241179022
P070	<i>ATG4B</i>	7	02q37.3	242247199	242247270
P029	<i>VHL</i>	3	03p25.3	10163206	10163273
P036	<i>CHL1</i>	5	03p26.3	344888	344961
P070	<i>CHL1</i>	3	03p26.3	336381	336454
P029	<i>CPOX</i>	4	03q12	99790262	99790329
P036	<i>BDH1</i>	4	03q29	198757687	198757752
P070	<i>KIAA0226</i>	22	03q29	198883877	198883950
P036	<i>PIGG</i>	7	04p16.3	504891	504969
P064	<i>TACC3</i>	4	04p16.3	1700130	1700202
P064	<i>WHSC1</i>	5	04p16.3	1872456	1872525
P064	<i>WHSC1</i>	25	04p16.3	1950156	1950230
P064	<i>WHSC1</i>	9	04p16.3	1902200	1902274
P070	<i>PIGG</i>	8	04p16.3	505735	505807
P250	<i>SLC25A4</i>	2	04q35.1	186303263	186303335
P029 / P250	<i>KLKB1</i>	3	04q35.2	187390325	187390398
P036	<i>TRIML2</i>	2	04q35.2	189262981	189263053
P070	<i>FRG1</i>	1	04q35.2	191099071	191099141
P064	<i>CTNND2</i>	2	05p15.2	11785304	11785369

P036	<i>PDCD6</i>	6	05p15.33	367567	367640
P064	<i>CLPTM1L</i>	5	05p15.33	1391037	1391097
P064	<i>IRX4</i>	5	05p15.33	1931281	1931344
P064	<i>TERT</i>	2	05p15.33	1346495	1346564
P064	<i>TERT</i>	13	05p15.33	1311706	1311769
P070	<i>CCDC127</i>	3	05p15.33	258918	258985
P064	<i>NSD1</i>	2	05q35.2	176493894	176493966
P029	<i>NSD1</i>	2	05q35.3	176492580	176492635
P036	<i>GNB2L1</i>	6	05q35.3	180597753	180597825
P064	<i>NSD1</i>	24	05q35.3	176654366	176654433
P064	<i>NSD1</i>	15	05q35.3	176619619	176619683
P070	<i>GNB2L1</i>	2	05q35.3	180601812	180601884
P036	<i>IRF4</i>	2	06p25.3	338177	338242
P070	<i>IRF4</i>	3	06p25.3	339901	339971
P036	<i>PSMB1</i>	5	06q27	170688255	170688327
P070	<i>TBP</i>	2	06q27	170707891	170707964
P029	<i>HOXA3</i>	7	07p15	27116666	27116724
P064	<i>TWIST1</i>	1	07p21.1	19125427	19125497
P064	<i>TWIST1</i>	1	07p21.1	19123766	19123828
P029	<i>TWIST1</i>	1	07p21.2	19122927	19122989
P029	<i>PMS2</i>	7	07p22	6003490	6003554
P036	<i>ADAP1</i>	4	07p22.3	926130	926193
P070	<i>UNC84A</i>	5	07p22.3	844978	845042
P029	<i>CLIP2</i>	3	07q11.23	73390805	73390863
P029	<i>CLIP2</i>	14	07q11.23	73449357	73449415
P029	<i>ELN</i>	1	07q11.23	73080388	73080448
P029	<i>ELN</i>	33	07q11.23	73120975	73121045
P029	<i>ELN</i>	20	07q11.23	73108586	73108647
P029	<i>FKBP6</i>	9	07q11.23	72410284	72410348
P029 / P064	<i>FZD9</i>	1	07q11.23	72487583	72487650
P029	<i>LIMK1</i>	4	07q11.23	73149370	73149442
P029	<i>RFC2</i>	11	07q11.23	73284387	73284454
P029	<i>STX1A</i>	8	07q11.23	72755115	72755188
P029	<i>TBL2</i>	3	07q11.23	72626283	72626350
P064	<i>ELN</i>	4	07q11.23	73090003	73090066
P064	<i>ELN</i>	27	07q11.23	73115357	73115423
P064 / P029	<i>ELN</i>	6	07q11.23	73094914	73094972
P029	<i>CASP2</i>	11	07q35	142711002	142711054
P036	<i>VIPR2</i>	3	07q36.3	158595271	158595340

P070	<i>VIPR2</i>	2	07q36.3	158627924	158627991
P250	<i>GATA4</i>	7	08p23.1	11653542	11653609
P250	<i>MSRA</i>	2	08p23.1	10102752	10102819
P250	<i>PPP1R3B</i>	2	08p23.1	9036240	9036313
P036	<i>FBXO25</i>	9	08p23.3	403076	403141
P070	<i>FBXO25</i>	8	08p23.3	398391	398466
P029	<i>TPD52</i>	9	08q21	81112843	81112913
P029	<i>LRP12</i>	5	08q22.3	105578750	105578816
P064	<i>TRPS1</i>	3	08q23.3	116700557	116700630
P064	<i>EIF3H</i>	2	08q24.11	117837051	117837121
P064	<i>EXT1</i>	2	08q24.11	118918440	118918506
P036	<i>ZC3H3</i>	2	08q24.3	144692300	144692367
P070	<i>RECQL4</i>	17	08q24.3	145708631	145708695
P036	<i>DMRT1</i>	2	09p24.3	837054	837117
P070	<i>DOCK8</i>	23	09p24.3	376334	376404
P029	<i>PCSK5</i>	10	09q21.3	77938853	77938920
P036	<i>EHMT1</i>	24	09q34.3	139830278	139830335
P070	<i>EHMT1</i>	10	09q34.3	139776962	139777023
P250	<i>EHMT1</i>	3	09q34.3	139731001	139731062
P250	<i>EHMT1</i>	17	09q34.3	139805146	139805210
P250	<i>NEBL</i>	6	10p12.31	21226273	21226342
P250	<i>CUGBP2</i>	3	10p14	11017023	11017090
P250	<i>CUGBP2</i>	4	10p14	11247526	11247596
P250	<i>TCEB1P3</i>	1	10p14	10588971	10589047
P250	<i>GATA3</i>	3	10p15.1	8140560	8140624
P250	<i>GATA3</i>	6	10p15.1	8155803	8155870
P036	<i>DIP2C</i>	4	10p15.3	476820	476884
P070	<i>ZMYND11</i>	2a	10p15.3	215989	216058
P029	<i>ANXA7</i>	3	10q22	74828036	74828106
P029	<i>VCL</i>	22	10q22	75547782	75547843
P036	<i>PAOX</i>	3	10q26.3	135045088	135045154
P070	<i>ECHS1</i>	8	10q26.3	135026355	135026422
P064	<i>DCDC1</i>	4	11p13	31285887	31285951
P064	<i>PAX6</i>	3	11p13	31789032	31789103
P064	<i>FSHB</i>	3	11p14.1	30212266	30212330
P036	<i>RIC8A</i>	3	11p15.5	199935	199999
P070	<i>BET1L</i>	3	11p15.5	195448	195520
P029	<i>MEN1</i>	10	11q13	64328444	64328508
P036	<i>NCAPD3</i>	2	11q25	133595730	133595797

P070	<i>IGSF9B</i>	20	11q25	133292680	133292754
P036	<i>SLC6A12</i>	19	12p13.33	169603	169674
P070	<i>JARID1A</i>	23	12p13.33	286991	287064
P036	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	132243516	132243586
P070	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	132242375	132242452
P070	<i>PSPC1</i>	1	13q11	19254548	19254619
P036	<i>PSPC1</i>	2	13q12.11	19244553	19244622
P036	<i>F7</i>	6	13q34	112817975	112818043
P070	<i>CDC16</i>	8	13q34	114027450	114027519
P036	<i>CCNB1IP1</i>	4	14q11.2	19863569	19863642
P070	<i>PARP2</i>	16	14q11.2	19895643	19895709
P036	<i>MTA1</i>	8	14q32.33	104995681	104995746
P070	<i>MTA1</i>	7	14q32.33	104991619	104991689
P036	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2	21362818	21362879
P064	<i>SNRPN</i>	ilha CpG	15q11.2	22750781	22750852
P064	<i>SNRPN</i>	5	15q11.2	22716791	22716857
P064	<i>UBE3A</i>	5	15q11.2	23201527	23201599
P064	<i>UBE3A</i>	14	15q11.2	23135402	23135477
P070	<i>NDN</i>	1	15q11.2	21482490	21482551
P036	<i>ALDH1A3</i>	11	15q26.3	99264898	99264971
P070	<i>TM2D3</i>	3	15q26.3	100007800	100007870
P036	<i>POLR3K</i>	1	16p13.3	43278	43345
P064	<i>CREBBP</i>	31	16p13.3	3717675	3717743
P064	<i>CREBBP</i>	3	16p13.3	3800566	3800638
P070	<i>DECR2</i>	9	16p13.3	402228	402289
P036	<i>GAS8</i>	6	16q24.3	88630416	88630484
P070	<i>GAS8</i>	11	16q24.3	88637625	88637685
P064	<i>RAI1</i>	6	17p11.2	17654897	17654968
P064	<i>RAI1</i>	1	17p11.2	17525905	17525962
P064	<i>RAI1</i>	3	17p11.2	17636976	17637039
P064	<i>TOM1L2</i>	1	17p11.2	17816505	17816575
P029	<i>ASPA</i>	4	17p13.3	3339264	3339337
P036 / P250	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3	169259	169330
P064	<i>METTL16</i>	1	17p13.3	2361823	2361890
P064	<i>PAFAH1B1</i>	1	17p13.3	2443762	2443818
P064	<i>PAFAH1B1</i>	11	17p13.3	2531787	2531857
P064	<i>PAFAH1B1</i>	2	17p13.3	2488280	2488352
P070 / P250	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3	183588	183659
P250	<i>GEMIN4</i>	2	17p13.3	596607	596671

P250	<i>YWHAE</i>	4	17p13.3	1211255	1211325
P029	<i>NEUROD2</i>	2	17q12	35013588	35013661
P036	<i>TBCD</i>	18	17q25.3	78451828	78451896
P070	<i>SECTM1</i>	4	17q25.3	77874063	77874127
P036	<i>USP14</i>	7	18p11.32	186695	186767
P070	<i>THOC1</i>	21	18p11.32	204731	204801
P036	<i>RBFA</i>	4	18q23	75899526	75899599
P070	<i>CTDP1</i>	9	18q23	75575783	75575851
P036	<i>CDC34</i>	5	19p13.3	492438	492506
P070	<i>PPAP2C</i>	7	19p13.3	232437	232498
P036	<i>CHMP2A</i>	6	19q13.43	63754814	63754869
P070	<i>CHMP2A</i>	3	19q13.43	63755470	63755537
P064	<i>JAG1</i>	21	20p12.2	10571164	10571225
P064	<i>JAG1</i>	1	20p12.2	10602274	10602343
P036	<i>SOX12</i>	1	20p13	255053	255112
P070	<i>ZCCHC3</i>	1	20p13	226979	227046
P036	<i>OPRL1</i>	5	20q13.33	62194517	62194598
P070	<i>UCKL1</i>	6	20q13.33	62046371	62046438
P036	<i>RBM11</i>	1	21q11.2	14510394	14510467
P070	<i>HSPA13</i>	2	21q11.2	14675469	14675536
P036	<i>PRMT2</i>	4	21q22.3	46887914	46887971
P070	<i>S100B</i>	2	21q22.3	46846658	46846729
P070 / P250	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	15959672	15959739
P029	<i>MED15</i>	10	22q11.21	19266745	19266813
P036 / P250	<i>BID</i>	4	22q11.21	16606684	16606759
P064	<i>GNB1L</i>	8	22q11.21	18156405	18156463
P064	<i>SNAP29</i>	3	22q11.21	19565377	19565455
P064 / P250	<i>CDC45</i>	1	22q11.21	17847478	17847540
P064 / P250	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	17621597	17621661
P064 / P250	<i>DGCR8</i>	2	22q11.21	18453612	18453678
P064 / P250	<i>MED15</i>	10	22q11.21	19266745	19266813
P064 / P250	<i>ZNF74</i>	2	22q11.21	19079428	19079495
P250	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	17891318	17891378
P250	<i>GP1BB</i>	2	22q11.21	18091521	18091580
P250	<i>HIC2</i>	2	22q11.21	20129442	20129511
P250	<i>HIRA</i>	1	22q11.21	17699015	17699079
P250	<i>KLHL22</i>	1	22q11.21	19173307	19173367
P250	<i>LZTR1</i>	2	22q11.21	19679191	19679261
P250	<i>MICAL3</i>	20	22q11.21	16704655	16704719

P250	<i>PPIL2</i>	20	22q11.21	20379687	20379748
P250	<i>SLC25A18</i>	1	22q11.21	16423313	16423380
P250	<i>SNAP29</i>	1	22q11.21	19572014	19572084
P250	<i>TBX1</i>	2	22q11.21	18127115	18127178
P250	<i>TBX1</i>	7	22q11.21	18133292	18133352
P250	<i>TXNRD2</i>	1	22q11.21	18266225	18266285
P250	<i>USP18</i>	1	22q11.21	17012924	17012985
P250	<i>GNAZ</i>	3	22q11.22	21795392	21795456
P250	<i>RAB36</i>	1	22q11.22	21817561	21817617
P250	<i>RTDR1</i>	5	22q11.22	21734047	21734115
P250	<i>RTDR1</i>	2	22q11.22	21812539	21812602
P250	<i>TOP3B</i>	7	22q11.22	20652996	20653065
P250	<i>SMARCB1</i>	1	22q11.23	22459370	22459434
P250	<i>SMARCB1</i>	9	22q11.23	22506362	22506429
P250	<i>SNRPD3</i>	2	22q11.23	23283701	23283765
P036	<i>RABL2B</i>	9	22q13.33	49553070	49553142
P064	<i>SHANK3</i>	18	22q13.33	49491410	49491470
P064 / P070 / P250	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	49413270	49413327
P250	<i>SHANK3</i>	22	22q13.33	49507581	49507645
P036	<i>SH3YL1</i>	20	2p25.3	252450	252520
P029	<i>ABCB1</i>	17	7q21.1	87068223	87068283
P070	<i>SHOX</i>	5	Xp22.33PAR	521733	521796
P036	<i>SHOX</i>	4	Xp22PAR	521543	521613
P036	<i>VAMP7</i>	4	Xq28	154781022	154781096
P070	<i>VAMP7</i>	8	Xq28PAR	154825695	154825768
P036	<i>ZFY</i>	4	Yp11.31	2889246	2889282

ANEXO E

Artigo publicado: *Molecular Genetics and Genomics*.

DOI:10.1007/s00438-014-0876-7.

Complex structural rearrangement features suggesting *chromoanagenesis* mechanism in a case of 1p36 deletion syndrome

Zanardo EA^{1,2}, Piazzon FB¹, Dutra RL^{1,2}, Dias AT¹, Montenegro MM^{1,2}, Novo-Filho GM^{1,2}, Costa TVMM¹, Nascimento AM^{1,2}, Kim CA², Kulikowski LD^{1,2}

¹ Department of Pathology, Laboratório de Citogenômica, LIM 03, Universidade de São Paulo - HC FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

² Department of Pediatrics, Instituto da Criança, LIM 36, Universidade de São Paulo - HC FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Genome rearrangements are caused by the erroneous repair of DNA double-strand breaks (DSBs), leading to several alterations that results in loss or gain of the structural genomic of a dosage sensitive genes. However, the mechanisms that promote the complexity of rearrangements of congenital or developmental defects in human disease are poorly unclear. The investigation of complex genomic abnormalities could help to elucidate the mechanisms and causes for the formation and facilitate the understanding of congenital or developmental defects in human disease. We here report one case of a patient with atypical clinical features of the 1p36 syndrome and the use of cytogenomic techniques to characterize the genomic alterations. Analysis by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and array revealed a complex rearrangement in the 1p36.3 region with deletions and duplication interspaced by normal sequences. We also suggest that *chromoanagenesis* could be a possible mechanism involved in the repair and stabilization of this rearrangement.

Keywords: Complex structural rearrangement; *chromoanagenesis*; 1p36 syndrome; copy number variation; cytogenomic techniques

INTRODUCTION

The human genome can be modulated by several mutational mechanisms that occasionally result in structural variation and thus congenital alterations and disease (Kloosterman et al. 2011; Sobreira et al. 2011). Some genome rearrangements are caused by the erroneous repair of DNA double-strand breaks (DSBs), generating deletions, duplications, inversions, and translocations (Holland and Cleveland, 2012).

One of the most common subtelomeric microdeletion syndromes, the monosomy 1p36 syndrome (OMIM 607872), is characterized by a variety of chromosomal rearrangements (terminal deletions, interstitial deletions, derivative chromosomes, and complex rearrangements) (Heilstedt et al. 2003; Gajecka et al. 2007; Giannikou et al. 2012) and consequently phenotypic complexity because it is very difficult to correlate the set

of different alterations found in a single patient with the clinical phenotype (Chen et al. 2008). Therefore, many patients with 1p36 deletion syndrome associated with variable phenotype have several rearrangements, most likely with cryptic complex alterations.

The development of cytogenomic techniques, such as high-density arrays and next-generation sequencing technologies (Kloosterman et al. 2011; Chiang et al. 2012), has allowed the detection of complex genomic rearrangements (CGR) and cryptic breakpoints. Thus, many CGR detected to date might actually be more complex than initially thought (Zhang et al. 2009; Quilan and Hall, 2012).

In some studies, CGR in the 1p36 region were detected ranging from 6.7 to 12.5% (Shaffer et al. 2006; Gajecka et al. 2007). Although the understanding of the genetic architecture of chromosomal alterations has recently expanded with hypotheses about the mechanisms for the formation of such CGR, many of which involve some degree of homology (Colnaghi et al. 2011; Chiang et al. 2012), these mechanisms have remained elusive.

Different mechanisms were suggested to explain the formation of such rearrangements, one of them is the NHEJ repair resulting in end-to-end fusion with little or no sequences of homology in the breakpoints or the microhomology-dependent BIR when a single end of a DSB invades a DNA duplex at any chromosome location, based on few nucleotides of homology (D'Angelo et al. 2009; Hastings et al. 2009). Recently, several authors have described a novel class of genomic rearrangement in which numerous copy number alterations and multiple breakpoints concentrated on a single chromosome or region are apparently acquired in one single catastrophic event (Stephens et al. 2011; Holland and Cleveland, 2012). According to Kloosterman and colleagues, this catastrophic event may generate structural variation in the germline that results in congenital defects; regardless, the mechanisms behind these cataclysmic genome disruptions are unknown (Kloosterman et al. 2011; Liu et al. 2011; Maher and Wilson, 2012).

The investigation of complex genomic abnormalities could help to elucidate the mechanisms and causes for the formation and facilitate the understanding of congenital or developmental defects in human disease. Thus, we here report one case of a patient with some clinical features of the 1p36 syndrome and the use of cytogenomic techniques to characterize the size and breakpoint of the alterations. We also consider the mechanisms underlying the formation of the complex rearrangements to better understand the phenotypic variability.

CLINICAL / CASE REPORT

The patient is the second child of healthy parents. She was born pre-term at 36 5/7 weeks of gestation. At birth, she weighed 2,175 kg; her head circumference was 33 cm, and length was 45 cm. In her first evaluation she presented growth retardation, hypertrichosis, hypotonia, hypothyroidism, and seizures. Notable findings on physical examination included a prominent forehead, epicanthus, ocular hypertelorism, low-set ears, anteverted nares, ogival palate, delayed dentition, fifth finger clinodactyly of the hands, and overlapping of the third to the second toe. She presents some atypical findings as hypertrichosis, synophrys, prominent supra orbital ridges, straight eyebrows, long and prominent philtrum and a deep sacral pit. The Brainstem electric response audiometry (BERA) test showed sensorineural hearing loss. The echocardiogram at one month of age revealed stenosis of the left pulmonary artery, with significant hemodynamic effects; the patient underwent surgical correction at 6 months, with a good outcome.

METHODS

Cytogenetic analysis

To identify numerical and structural chromosomal abnormalities, metaphase chromosomes from the patient and her parents were obtained from peripheral blood lymphocyte samples, and GTG banded was performed using standard procedures. Twenty metaphases at 550-chromosome band resolution (≥ 5 Mb) were analyzed and classified according to ISCN 2013 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) guidelines.

Molecular analysis

Genomic DNA from the patient and her parents was isolated from 3 mL of peripheral whole blood using a commercially available DNA isolation kit (QIAamp DNA Mini Kit) (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The quality and quantity of the DNA samples were determined using a NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences).

MLPA (Multiplex ligation-depnt probe amplification)

The genomic DNA of the proband and her parents were screened with three MLPA kits: one for the most common microdeletion / microduplication syndromes - SALSA P064 Mental Retardation 1, which includes the probes *TNFRSF18*, *TNFRSF4*, *SCNN1D*, *GNB1*, *SKI*, *PANK4* (*FLJ10782*), *TP73* for the 1p36 region; and two for subtelomeric imbalances - SALSA P036 Human Telomere, which includes the probe *TNFRSF4* for the 1p subtelomere and P070 Human Telomere with the probe *TNFRSF18* for the same subtelomere (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) (figure 1C).

The steps of DNA denaturation, hybridization of MLPA probes, ligation, and PCR reactions were performed according to the manufacturer's instructions, as described in Schouten et al (2002). The separation of amplification products by electrophoresis was performed using an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), and the data were analyzed using GeneMarker® software, version 1.6, (www.softgenetics.com - Softgenetics, LLC, State College, PA, USA).

The peak area of each fragment was compared to that of a control sample, and the results were considered abnormal when the relative peak height ratio was below 0.75 (deletion) or above 1.25 (duplication). The details of the regions detected by each kit can be found at www.mlpa.com.

SNP- array analysis

The SNP array of the patient was performed using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (1.8 million genetic markers), which contains 906,600 single-nucleotide polymorphism probes (SNPs) and over 946,000 probes for the detection of copy number variations, with a median physical inter-marker distance of 680 bp (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The manufacturer's recommended protocol (<http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals>) was followed.

The data were analyzed using Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software, version 1.2 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). The genomic positions are given as mapped to the GRCh37/hg19 genome build.

Real-time PCR

Regions of DNA normal copy number identified by SNP-array were confirmed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied-Biosystems) and the DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR kit (Thermo Scientific, Lithuania). The amplification mixtures (20 µL) contained DyNAmo™ ColorFlash master mix (1X), ROX™ (1X), 0.37 µM of each forward and reverse primer, and 20 ng of template DNA, and final volume was adjusted with sterile water. The PCR cycling conditions were as follows: 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, and the dissociation curve was realized at 60°C – 95°C. The primer sequences are shown in table 1. Each assay included a no-template control, a normal control DNA used as a calibrator (evaluated previously by SNP-array and without any copy number change), the test sample DNA, and the albumin gene as endogenous control (them all in triplicate).

Table 1: Primer sequences used for quantitative real-time PCR reactions

Region	Forward primer	Reverse primer	Localization
17 kb normal region	GGCTCTCGTCTTTAGGGGTG	TGGAAAGGGCCGAGGATTC	Chr1: 2,467,205 – 2,467,280
27 kb normal region	ATGTGCTCGTCAGTGGAGTG	AACTGTGGCTCAACTCTGGG	Chr1: 3,468,632 – 3,468,725

The results were expressed as the threshold cycle (Ct). We compared the Cts means to determine the differences and thus to relate the copy numbers in the region studied of the test sample with the normal control: Quantification target (test sample) = target (Ct) / endogenous control (Ct); Quantification target (normal control) = target (Ct) / endogenous control (Ct). If the result of the comparison between the test sample with the normal control is similar, then we suggest both samples have the same number of copies, but if the result of the test sample is half or twice of the normal control, suggesting a deletion or a duplication respectively.

RESULTS

Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis

GTG band analysis showed a normal karyotype in the child and her parents. To confirm the suspected diagnosis of 1p36 syndrome, we initially performed MLPA that revealed normal results for both parents and an unexpected result for the probando.

The MLPA assay using the P070 and P036 kits with subtelomeric probes showed deletions of the *TNFRSF4* and *TNFRSF18* probes at 1p36.33, whereas the P064 kit revealed an atypical deletion of all probes investigated in the region 1p36, except the *TP73* probe, presenting a normal copy number (figure 1). Subsequently, to better delineate the deletion detected by the MLPA, a genomic analysis by SNP-array was performed, which showed multiple copy number changes involving a single chromosome region, including normal genomic regions intercalated with regions deleted (~1.9 Mb and ~1 Mb) and duplicated (~0.2 Mb).

Figure 1: Results of MLPA technique. In (A) are the probes presents in the 1p36 region by the P064 kit. In gray are the probes considered deleted and indicated by the red arrow is the probe *TP73* considered normal. In (B) is the graphic of the MLPA reaction with all probes used in the P064 kit, and those that are between green lines are the probes that no show copy number variation and those below the green line (below 0.5 ratio) corresponding to deletion and they are all in the 1p36 region. And the figure (C) show all probes evaluated in the region 1p36 by the P036, P070 and P064 kits.

We observed a normal copy subtelomeric sequence, followed by a deletion (~1.9 Mb – 564,620-2,456,203), followed by a normal copy sequence (~17 kb), followed by another deletion (~1 Mb – 2,473,257-3,446,813), followed by a normal copy sequence (~27 kb), followed by a duplication (~0.2 Mb – 3,474,630-3,641,681) at the 1p36 region (figure 2 and 3) (table 2).

Figure 2: Results of SNP-array technique. The red regions corresponding to deletions of ~1,9 Mb and ~1 Mb; And the blue region corresponding to duplication of 0,2 Mb.

Figure 3: Scheme of alterations present in the patient evaluated in this study by the SNP-array technique. The blue rectangles represent no copy number change and they are considered normal (Nml); the red rectangles represents the deleted segments and the green represents the duplicated segments. The dotted rectangles refer to the location of the MLPA probes, all of which are located in the largest rectangle, with the exception of *TP73* probe that is located immediately after the duplicated region viewed in the array.

Table 2: Details of the genomic localization (start and end) and size of the copy number in the 1p36 region by SNP-array

Genome	Start	End	Size
Normal	0	564,620	564,620 bp
Deletion	564,620	2,456,203	1,891,584 bp
Normal	2,456,203	2,473,257	17,055 bp
Deletion	2,473,257	3,446,813	973,557 bp
Normal	3,446,813	3,474,630	27,818 bp
Duplication	3,474,630	3,641,681	167,052 bp

According the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) and DGV Database of Genomic Variants - (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

The normal copy sequences were confirmed by Real-time PCR, of which the comparison of the quantification target in the test sample and normal control were similar for the both normal regions (17 kb and 27 kb) (table 3 and 4).

Table 3: Quantitative real-time PCR results

Region	Ct mean of test sample	Ct mean of normal control
17 kb normal region	~24,34	~23,67
27 kb normal region	~22,87	~23,91
Endogenous control	~19,70	~19,76

Table 4: Comparison of the Ct mean between the target and endogenous control for the 17 kb and 27 kb normal region

Region	Quantification target (test sample)	Quantification target (normal control)	Difference of the quantification target
17 kb normal region	~1,24	~1,20	~0,04
27 kb normal region	~1,16	~1,21	~0,05

DISCUSSION

The main clinical features of 1p36 syndrome include developmental delay, mental retardation, hypotonia, seizures, cardiac defects, microcephaly, hearing impairment and distinct dysmorphic features (Gajecka et al. 2007; Chen et al. 2008; Fitzgibbon et al. 2008; Giannikou et al. 2012). However, the overlapping of variable clinical findings may have contributed to a low ascertainment rate of the alterations in some patients. In these cases, the diagnosis was most likely completed using low-resolution techniques, such as cytogenetic or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis only, and the evaluation of the patient as having or not having a deletion, without considering possible CGR, map breakpoints, or phenotype correlation with actual changes. Consequently, such alterations have been under-diagnosed (Gajecka et al. 2007; Fitzgibbon et al. 2008).

The clinical features in the 1p36 syndrome are heterogeneous and not all patients exhibit the same characteristics. The patient evaluated in this study has clinical features present in most of patients with the 1p36 syndrome, however she doesn't have all of the features described in this syndrome. Furthermore she has some atypical features, as hypertrichosis, synophrys, prominent supra orbital ridges, straight eyebrows, long and prominent philtrum and a deep sacral pit. This clinical variability could be explained by complex alterations in the 1p36 region. To date some cases of CGR were described associated with an abnormal phenotype. These patients with CGR in the 1p36 region present deleted sequences followed by duplicated sequences or deleted sequence between two duplicated sequences (Chen et al. 2008; D'Angelo et al. 2009).

The identification of cryptic complex changes is possible using advanced cytogenomic techniques, which have expanded the understanding of the genetic architecture of human chromosomal rearrangements and the variety of clinical phenotypes (Fitzgibbon et al. 2008). The array technology is a high-throughput method used to detect small copy number changes within the genome and to define with accuracy the breakpoints of rearrangements (Chen et al. 2008; Fitzgibbon et al. 2008; Giannikou et al. 2012).

Liu and collaborators described 17 cases with CGR patterns by array comparative genomic

hybridization of different chromosomes and correlated the rearrangements with the standard of catastrophic changes described recently in cancer (Liu et al. 2011).

On investigation of the patient, two deletions of less than 2 Mb and one duplication of approximately 167 kb, separated by a normal region of 17 and 27 kb, were detected (figure 2 and 3). This pattern of alteration share similarities with a phenomenon termed *chromoanagenesis* (*chromo* for chromosomes and *anagenesis* for rebirth) in which the mechanism termed *chromothripsis* (from Greek *chromo* for chromosomes and *thripsis* for shattering) can occur via a single event, generating a cellular crisis in which distinct chromosome or chromosomal regions become fragmented into many parts that are then pieced together incorrectly. Alternatively, the mechanism termed *chromoanasythesis* (*chromo* for chromosomes and *anasythesis* for reconstitution), produced by serial microhomology-mediated template switching during DNA replication, can occur (Liu et al. 2011; Stephens et al. 2011; Forment et al. 2012; Holland and Cleveland, 2012).

Chromothripsis occurs after several DSBs concentrated in a region of the genome, with the many pieces randomly reassembled by NHEJ (non-homologous end joining) in a way that does not necessarily relate to their original order or orientation (Stephens et al. 2011; Forment et al. 2012). This mechanism generates complex rearrangements formed by the incorrect ligation of ends with little or no sequence of homology and the insertion of some nucleotides, with the further loss of some fragments to generate deletions (Kloosterman et al. 2011; Holland and Cleveland, 2012).

The other mechanism that can be involved in the formation of complex rearrangements is *chromoanasythesis*, which is generally involved in constitutional rearrangements that show complexity, microhomology at breakpoints, and occasionally the fusions of distant sequences and is indicative of a DNA replication-based mechanism as the causative agent, including FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) and/or MMBIR (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication) (Zhang et al. 2009; Liu et al. 2011; Chiang et al. 2012; Holland and Cleveland, 2012).

FoSTeS occurs when the DNA replication forks stall due to a DNA lesion or an error, allowing the replication fork to invade another fork through an area of microhomology. This process may repeat multiple times, leading to serial template switching before the completion of DNA synthesis on the original template. Although the new template strand is placed in physical proximity to the original replication fork, they may be separated by large stretches of DNA sequences and can be on the same or different chromosomes. This process can generate deletions, duplications, triplications, and insertions, and the orientation and complexity of the erroneously synthesized fragments depend on the direction of the initial invasion and of the serial engagement of FoSTeS (Zhang et al. 2009; Colnaghi et al. 2011; Forment et al. 2012; Holland and Cleveland, 2012).

The second mechanism involved in *chromoanasythesis* is MMBIR, which is initiated when a replication fork collapses after encountering a nick/single or DSBs. The end of the DNA DSBs then invades a DNA sequence with microhomology and establishes a replication fork. This event can be repeated in adjacent regions, resulting in CGR, with replication eventually continuing to the end of the chromosome (Colnaghi et al. 2011; Holland and Cleveland, 2012).

Although *chromoanasythesis* involving the replication-based mechanism FoSTeS and MMBIR is the most likely explanation for the generation of constitutional complex rearrangements in patients with congenital or developmental abnormalities, chromosome shattering by *chromothripsis* and replaced together by NHEJ is also involved in some germline cases, depending on the breakpoint features and the complexity of the alterations (Holland and Cleveland, 2012; Maher and Wilson, 2012). Kloosterman analyzed multiple rearrangements in patients with congenital abnormalities and associated with non-homologous mechanisms of break repair, and the breakpoint junctions exhibited microhomology, a lack of homology, or small insertions and deletions (Kloosterman et al. 2011). In contrast, Liu observed similarity with a replicative process, such as FoSTeS or MMBIR, in small template insertions and microhomology at the breakpoint junctions of rearrangements (Liu et al. 2011). Based on our analysis of the patient in this study, we suggest that the most likely mechanism involved in complex rearrangements could be FoSTeS/MMBIR associated with *chromoanasythesis*, due to the pattern of alterations, with deletions and duplications separated by normal sequences without more complex changes, such as triplication, or involvement with another chromosomal region or chromosome. The understanding these mechanisms may provide insight regarding genomic syndromes, such as how and why rearrangements occur and the clinical consequences. Independently of the underlying mechanism, the genome of patients with atypical features should be better investigated using advanced techniques to correlate the alterations with the phenotype and to improve the diagnosis and clinical

ascertainment. Thus, analysis of additional cases using next generation sequencing may yield information as to whether FoSTeS/MMBIR associated with *chromoanasythesis* are the mechanism most appropriate for the formation of the CGR.

REFERENCES

Chen E, Obolensky E, Rauven KA, Shaffer LG, Li X (2008) Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. *Am J Med Genet A* 146A(21):2785-90.

Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, Hanscom C, Heilbut A, Blumenthal I, Mills RE, Kirby A, Lindgren AM, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Bawden CS, Reid SJ, Faull RL, Snell RG, Hall IM, Shen Y, Ohsumi TK, Borowsky ML, Daly MJ, Lee C, Morton CC, MacDonald ME, Gusella JF, Talkowski ME (2012) Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* 44(4):390-7.

Colnaghi R, Carpenter G, Volker M, O'Driscoll M (2011) The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 22(8):875-85.

D'Angelo CS, Gajecka M, Kim CA, Gentles AJ, Glotzbach CD, Shaffer LG, KOiffmann CP (2009) Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements. *Hum Genet* 125(5-6):551-63.

Fitzgibbon GJ, Clayton-Smith J, Banka S, Hamilton SJ, Needham MM, Dore JK, Miller JT, Pawson GD, Gaunt L (2008) Array comparative genomic hybridisation-based identification of two imbalances of chromosome 1p in a 9-year-old girl with a monosomy 1p36 related phenotype and a family history of learning difficulties: a case report. *J Med Case Rep* 2:355.

Forment JV, Kaidi A, Jackson SP (2012) Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer* 12(10):663-70.

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

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

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10(8):551-64.

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72(5):1200-12.

Holland AJ, Cleveland DW (2012) Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 18(11):1630-8.

Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E (2011) Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet* 20(10):1916-24.

Liu P, Erez A, Nagamani SC, Dhar SU, Kołodziejska KE, Dharmadhikari AV, Cooper ML, Wiszniewska J, Zhang F, Withers MA, Bacino CA, Campos-Acevedo LD, Delgado MR, Freedenberg D, Garnica A, Grebe TA, Hernández-Almaguer D, Immken L, Lalani SR, McLean SD, Northrup H, Scaglia F, Strathearn L, Trapane P, Kang SH, Patel A, Cheung SW, Hastings PJ, Stankiewicz P, Lupski JR, Bi W (2011) Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 146(6):889-903.

Maher CA, Wilson RK (2012) Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process. *Cell* 148(1-2):29-32.

Quinlan AR, Hall IM (2012) Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. *Trends Genet* 28(1):43-53.

Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA (2006) Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 149(1):98-102.

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

Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Hoover-Fong JE, Hamosh A, Wheelan SJ, Valle D (2011) Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Res* 21(10):1720-7.

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144(1):27-40.

Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR (2009) Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25(7):298-307.

ANEXO F

Artigo submetido: *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*.

Cardiopatias congênitas como um sinal de alerta para o diagnóstico da deleção do 22q11.2

Congenital heart disease as a warning sign for the diagnosis of the 22q11.2 deletion

Marcília Sierro Grassi¹, Cristina M. A. Jacob¹, Leslie Domenici Kulikowski², Antonio C. Pastorino¹, Roberta Lelis Dutra¹, Nana Miura³, Marcelo B. Jatene³, Stephanie P. Pegler¹, Chong Ae Kim¹, Magda Carneiro-Sampaio¹.

¹Instituto da Criança – HC-FMUSP, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ³ Instituto do Coração – HC-FMUSP, São Paulo, Brasil

Palavras chave: Deleção do 22q11.2, Cardiopatias Congênitas, Hipocalcemia, dismorfismo, diagnóstico
Key Words: 22q11.2 deletion, congenital heart disease, hypocalcemia, dysmorphism, diagnosis

Resumo

Fundamento: Alertar para o diagnóstico da síndrome da deleção 22q11.2 (SD 22q11.2) em pacientes com cardiopatias congênitas. **Objetivo:** Descrever as principais cardiopatias, alterações fenotípicas, metabólicas e imunológicas em uma série de 60 pacientes com a SD22q11.2. **Métodos:** Foram incluídos 60 pacientes com SD22q11.2 avaliados entre 2007 e 2013 (M:F=1,3, idade variando de 14 dias a 20 anos e 3 m) em um centro pediátrico de referência para imunodeficiências primárias. O diagnóstico foi feito pela detecção da microdeleção 22q11.2 através do FISH (n=18 casos) e/ou MLPA (n=42 casos), associados a dados clínicos e laboratoriais. Foram destacadas as cardiopatias, aspectos fenotípicos evolutivos da fâcies, a hipocalcemia e alterações imunológicas associadas. **Resultados:** Cardiopatias congênitas ocorreram em 77% dos casos, sendo Tetralogia de Fallot em 38,3%. A correção cirúrgica foi realizada em 34 pacientes. Os dismorfismos craniofaciais foram detectados em 41 pacientes: face (60%) e/ou nariz alongados (53,3%), fenda palpebral estreita (50%), orelhas displásicas com hiperdobramento (48,3%), lábios finos (41,6%), dedos alongados (38,3%) e baixa estatura (36,6%). Hipocalcemia foi observada em 64,2% com redução do PTH em 25,9%. Observou-se número reduzido de linfócitos totais, CD4 e CD8 em 40%, 53,3%, e 33,3%, respectivamente. Detectou-se hipogamaglobulinemia em um paciente e redução das concentrações de IgM em outros 2. **Conclusão:** Deve-se suspeitar da SD22q11.2 em todos os portadores de cardiopatia congênita com hipocalcemia e/ou dismorfismos faciais, ressaltando-se que muitas dessas alterações podem ser evolutivas. A microdeleção 22q11.2 deve ser confirmada por testes moleculares em todos os pacientes.

Abstract

Alert for diagnosis of 22q11.2 deletion (SD22q11.2) syndrome in patients with congenital heart disease (CHD). **Objective:** To describe the main CHD, phenotypic, metabolic and immunological findings in a series of 60 patients diagnosed as SD22q11.2. **Methods:** Were included 60 patients with SD22q11.2 evaluated between 2007 and 2013 (M:F=1.3, age ranging from 14 days to 20 years and 3 months) in a pediatric

reference center for primary immunodeficiencies. The diagnosis was done by detection of 22q11.2 microdeletion using FISH (n=18 cases) and / or MLPA (n=42 cases). The CHD, evolutionary phenotypic aspects of facies, hypocalcemia and immunological changes associated were emphasized. **Results:** CHD were detected in 77% of cases, being Tetralogy of Fallot the most frequent defect (38.3%). Surgical correction was performed in 34 patients. Craniofacial dysmorphisms were detected in 41 patients: face (60%) and / or elongated nose (53.3%), narrow palpebral fissure (50%), dysplastic ears with folded over helical rim (48.3%), thin lips (41, 6%), elongated fingers (38.3%) and short stature (36.6%). Hypocalcemia was detected in 64.2% and laboratorial changes of parathyroid in 25.9%. Leukopenia, decrease of CD4 and CD8 count were present in 40%, 53.3% and 33.3%, respectively. Hypogammaglobulinemia was detected in one patient and decreased concentrations of IgM in the other two. **Conclusion:** Suspicion for SD22q11.2 could be done in all patients with CHD associated with hypocalcemia and/or facial dimorphisms, emphasizing that many of these changes may be evolutionary. The 22q11.2 microdeletion should be confirmed by molecular testing in all patients.

TEXTO

Introdução

A SD22q11.2 é considerada a microdeleção cromossômica mais frequente em seres humanos, com a incidência de 1:4000-5000 nascidos vivos.^{1,2} Hoje sabe-se que essa síndrome ocorre com frequência superior àquela previamente estimada, mas dados precisos sobre sua incidência em nosso país são desconhecidos.

As microdeleções na região 22q11.2 podem estar presentes em diferentes síndromes descritas anteriormente, tais como: a síndrome de DiGeorge (SDG), síndrome velocardiofacial, e síndrome da anomalia facial conotruncal, doenças estas que representam diferentes fenótipos da mesma alteração cromossômica, sendo hoje agrupadas e denominadas Síndrome da Deleção 22q11.2 (SD22q11.2).^{1,3} Essa microdeleção não é detectada pelo cariótipo por bandeamento G, exame citogenético rotineiro, sendo o diagnóstico molecular realizado por outras técnicas tais como testes de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) e/ou triagem genômica quantitativa por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).^{4,5}

As cardiopatias congênitas (CHD) representam uma das malformações mais frequentes cuja incidência varia de 8 a 10 por 1000 nascidos vivos e constituem uma importante causa de morbimortalidade no primeiro ano de vida.⁶ As cardiopatias associadas a outros tipos de malformações congênitas podem ser de etiologia monogênica: síndromes de Holt-Oram, de Marfan, de Fanconi ou de Noonan, ou cromossômica, tais como as síndromes de Down, da deleção do cromossoma 22q11.2 (SD22q11.2), da trissomia do 18 (síndrome de Edwards), da trissomia do 13 (síndrome de Patau)⁷. As CHD com defeitos conotruncais constituem importante característica presente em diferentes síndromes genéticas, especialmente na SD22q11.2.² Estima-se que 5% dos pacientes com cardiopatia apresentem SDG, considerada a segunda Imunodeficiência Primária mais comum⁸⁻¹¹.

As manifestações clínicas para a suspeita diagnóstica da SD22q11.2 são: CHD (75%), desenvolvimento psicomotor anormal (68%), convulsão decorrente de hipocalcemia (60%), insuficiência velofaríngea com voz anasalada (46%), anormalidades genito-urinárias (36%), anormalidades esqueléticas (17%) e dismorfismos faciais (11-17%).^{2,12-15} As alterações imunológicas da SD22q11.2 são variáveis e decorrentes da hipoplasia ou agenesia do timo, classicamente denominados como SDG pelos imunologistas.^{1,5,14-17}

O presente trabalho tem como objetivo descrever as principais cardiopatias, alterações fenotípicas, metabólicas e imunológicas em uma série de 60 pacientes com a SD22q11.2.

Métodos

Trata-se de estudo transversal onde foram avaliados todos os pacientes com SD22q11.2 em seguimento nas Unidades de Alergia e Imunologia e de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP, entre junho de 2007 até dezembro de 2013, sendo alguns pacientes da Unidade de Cardiologia Pediátrica do Instituto do Coração – HC-FMUSP encaminhados após busca ativa nesta instituição. A casuística foi composta por 60 crianças e adolescentes (34 masculinos), com idade variando de 14 dias a 20 anos e 3 meses (média de 114,2 meses e desvio padrão de 83 meses). Todos pertenciam a famílias brasileiras, sem predomínio da ascendência europeia, africana ou oriental. Os critérios diagnósticos utilizados foram aqueles

propostos pela *International Union of Immunological Societies-IUIS*¹⁸ como: sinais clínicos compatíveis e presença da microdeleção 22q11.2. Todos os pacientes apresentavam cariótipo prévio normal por bandejamento G. Foi preenchido um protocolo onde constavam dados de identificação, história clínica, exame físico e os resultados dos exames laboratoriais e citogenômicos.

O estudo molecular da microdeleção foi realizado no Laboratório de Citogenômica do Departamento de Patologia, utilizando a técnica de FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) com a sonda específica para a região 22q11.2. Foram utilizadas sondas comerciais de sequências únicas para a região específica em 22q11.2 (DGS/VCFS, TUPLE1 e N25 D22S75) probes (Cytocell, Cambridge, UK)^{4,19} e/ou a técnica de MLPA (Multiplex Ligationdependent Probe Amplification) utilizando diferentes kits (P036-E1,P070-B2,P064-B3) (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda – www.mlpa.com) e os dados gerados foram analisados por meio do *software* GeneMarker® (*Softgenetics, LLC, State College, PA, USA* – www.softgenetics.com). Essas técnicas estão demonstradas na Figura 1.

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente e por métodos de imagem pela Unidade de Cardiologia Pediátrica.

Para a avaliação da imunocompetência foram realizados: hemograma completo, dosagem sérica de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA por nefelometria), e determinação das subpopulações de linfócitos em sangue periférico (citometria de fluxo – BD FACSCalibur) no laboratório do Instituto Central do HC-FMUSP, sendo comparados com valores de referência já descritos^{20,21}

Outros exames realizados foram: dosagens séricas de paratormônio (método imunoenzimático quimioluminescente automatizado), cálcio iônico, cálcio total e fósforo (método automatizado colorimétrico), triiodotironina (T3), tiroxina (T4), tiroxina livre (T4 livre) e TSH (método de imunoensaio automatizado) além da dosagem de anticorpos antitireoglobulina e antiperoxidase (imunofluorescência indireta).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa do Hospital das Clínicas – CAPPesq, sob o número 0911/11.

Resultados

As CHD foram identificadas em 47 pacientes (77%) e a correção cirúrgica foi realizada em 34 desses, sendo que as mais frequentes foram a Tetralogia de Fallot, comunicação interventricular e atresia da artéria pulmonar, conforme descrito na Tabela 1 e Figura 2.

Outras características fenotípicas importantes encontradas nos 60 pacientes com a SD22q11.2 estão destacadas na Tabela 2. Aspectos da face, assim como morfologia das orelhas, boca, nariz e olhos de alguns pacientes são mostrados nas Figuras 3 e 4.

A presença de dismorfismos faciais não foi reconhecida em muitos casos no período neonatal e tornou-se mais evidente com o avançar da idade, como se pode observar na Figura 5.

Hipocalcemia foi diagnosticada em vinte e sete pacientes (64,2%) dos 42 pacientes em que foi realizada a dosagem de cálcio iônico, sendo que 16 (59,3%) ocorreram no período neonatal. Destes, a dosagem do PTH foi realizada em 27 pacientes, sendo detectada redução das concentrações em 7 pacientes (25,9%). As crises convulsivas ocorreram em 6 pacientes.

Durante o seguimento ambulatorial dos 20 pacientes com SD22q11.2 na fase escolar e na adolescência observamos que 11 evoluíram com alterações comportamentais e psiquiátricas. O achado mais comum foi o déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) em 6 pacientes, sendo que a forma mais frequente foi a hiperativa/ impulsiva (4 casos) e a outra forma da TDAH, que predomina com déficit de atenção, foi diagnosticada em dois pacientes. Outros achados foram: dificuldade do aprendizado (15%), ansiedade (10%) e retardo mental como se pode observar na Figura 6. Até o presente momento nenhum paciente evoluiu com transtorno obsessivo-compulsivo, esquizoafetivo ou psicótico.

Neste estudo, a contagem dos linfócitos totais estava reduzida em 40% dos pacientes (18/45 casos), os linfócitos CD4⁺ em 53,3% (16/30) e o CD8⁺ em 33,3% (10/30) conforme demonstrado no Gráfico 1. Na avaliação da imunidade humoral, detectou-se 2 pacientes com redução das concentrações de IgM (29,6 mg/dL e 17,6 mg/dL) e 1 paciente de 9 meses com IgG=328 mg/dL, atualmente em terapêutica de reposição de gamaglobulina endovenosa. Gráfico 2.

Discussão

Embora a SD22q11.2 seja considerada uma anomalia cromossômica relativamente frequente na literatura, em nosso país os cardiologistas, neonatologistas e pediatras não a tem reconhecido de uma forma sistemática, sendo raras as publicações com número significativo de pacientes, principalmente no primeiro ano de vida^{1,2}. Em estudo realizado no Hospital das Clínicas do HC-FMUSP relatando 1008 pacientes com imunodeficiência primária, no período de 33 anos, identificou apenas 32 pacientes com a SD22q11.2.¹⁰ Esses dados nos levaram à associação com a Unidade de Cardiologia Pediátrica do INCOR, visando uma busca ativa da microdeleção, resultando na duplicação do número de casos nos últimos dois anos.

As malformações cardíacas constituem a manifestação mais crítica da SD22q11.2, observada em 77% dos nossos casos, conforme dados na literatura acometendo entre 49 a 95% dos pacientes.^{1,22} Um dado a ser destacado nesta casuística foi a frequência mais elevada da Tetralogia de Fallot (38,3%) o que difere da literatura onde se descrevem valores entre 17,6 a 20%.²²⁻²⁴ Outro dado a ser ressaltado em nosso estudo foi a presença de comunicação interventricular associada à SD22q11.2, sendo esta a segunda cardiopatia congênita encontrada, diferindo da literatura onde as cardiopatias conotruncais são mais destacadas.

A recomendação para a pesquisa da SD22q11.2 destaca que em todos os recém-nascidos ou crianças com Tetralogia de Fallot, truncus arteriosus, interrupção do arco aórtico, anomalias isoladas do arco aórtico e defeito perimembranoso do septo ventricular com anomalia do arco aórtico sejam realizados os testes para a microdeleção do cromossomo 22q11.2. Nos demais pacientes com defeito perimembranoso do septo ventricular sem a anomalia do arco aórtico ou com outros tipos de cardiopatia congênita, associados a manifestações fenotípicas características, deve-se levantar a suspeita clínica da SD 22q11.2 devendo ser realizado a pesquisa da microdeleção.^{3,6,22,25}

Outro fato que chama a atenção para a importância do diagnóstico precoce da SD22q11.2, idealmente antes da cirurgia de correção da cardiopatia, é o relato da literatura de que a evolução pós cirúrgica desse grupo de pacientes apresente alto risco de complicações pós-operatórias, apesar da mortalidade ser semelhante, comparados com pacientes com as mesmas cardiopatias sem a presença da SD22q11.2.²⁶

Em associação com as CHD acima descritas, os fenótipos encontrados nesse estudo em especial os dismorfismos crânio faciais peculiares, assim como a hipocalcemia no período neonatal, podem ser essenciais para a suspeita diagnóstica de SD22q11.2. Cabe salientar que a maior parte das descrições clínicas da SD22q11.2 foi realizada em pacientes caucasóides e pela primeira vez este relato descreve com detalhes os dismorfismos faciais na população trihíbrida brasileira, resultante da mistura, desde o século XVI, de índios, africanos e portugueses.²⁷

Outro ponto interessante abordado no presente estudo e ainda não apresentado em outras descrições foi o aspecto evolutivo da fâcies e de outros dismorfismos. Embora os dismorfismos reconhecidos mais tardiamente como associados com a SD22q11.2 (pequenas fendas palpebrais, nariz alongado, orelhas com hiperdobramento) já estivessem presentes ao nascimento, a fâcies do recém-nascido e do lactente jovem chama menos atenção como uma “fâcies sindrômica” para o pediatra geral e/ou cardiologista nesta fase da vida.

As anomalias do palato ocorrem em 9-16% dos pacientes com a SD 22q11.2 e cursam com morbidade elevada, sendo fundamental a realização de um exame cuidadoso do palato, incluindo a identificação da úvula bífida, que pode indicar a presença da fenda palatina submucosa.^{2,14} Nessa série observamos que esse achado foi mais frequente do que o descrito na literatura. Goldmuntz et al em 2005 demonstraram que além da presença de fenda palatina, cerca de 80% dos pacientes apresentavam também insuficiência velofaríngea, manifestando-se com voz anasalada e distúrbios compensatórios da articulação.³ A voz anasalada é pouco valorizada para a suspeita diagnóstica, provavelmente por ser observada mais tardiamente, mas constitui mais um sinal de alerta para a síndrome.

A hipoplasia ou aplasia da glândula paratireoide é muito comum na SD22q11.2, devido ao acometimento na embriogênese do terceiro e quarto arcos faríngeos. Em 49% a 60% dos recém-nascidos com a síndrome, a hipocalcemia transitória pode estar presente, causando tetania e convulsões de difícil controle²², dados que se mostraram semelhantes nos pacientes aqui descritos. Os pediatras e cardiologistas devem ficar atentos para a presença de hipocalcemia no período neonatal, sem outra causa fisiopatológica aparente que é altamente sugestiva do diagnóstico da síndrome.

Outra manifestação variável na SD22q11.2 é a imunodeficiência, tida como decorrente da alteração do desenvolvimento do timo, sendo nesses casos ainda denominada como SDG. Aproximadamente 80% dos pacientes com a SDG têm alterações no sistema imunológico. Apesar de grande parte dos pacientes

apresentarem ausência do timo ou hipoplasia tímica, a maioria apresenta imunodeficiência leve a moderada, independentemente das outras características clínicas.^{28,29} O estudo realizado por Patel et al. mostrou que os níveis baixos de imunoglobulinas estão presentes em uma minoria de pacientes e, em geral, entre 2% e 3% necessitaram da administração de imunoglobulina de reposição.²⁹ No nosso estudo 3 casos apresentavam valores reduzidos de imunoglobulinas, com indicação de reposição de imunoglobulina em apenas 1 caso.

Como nos portadores da SD22q11.2 as alterações iniciais descritas podem ser a hiperatividade, ansiedade e depressão, os autores enfatizam a importância do diagnóstico precoce e do seguimento multiprofissional adequado à esses pacientes. O diagnóstico dos transtornos de déficit de atenção (TDAH), ansiedade, humor e do espectro do autismo podem ocorrer em um terço a metade das crianças com a deleção. As alterações do humor e os transtornos psicóticos podem aumentar de forma significativa durante a idade adulta jovem, sendo fundamental a monitorização cuidadosa dos sintomas psiquiátricos durante a adolescência e início da idade adulta.³⁰ Esses pacientes também podem ter baixo rendimento escolar, tornando-se um importante aspecto a ser abordado nas instituições de ensino.

É imperativo que se disseminem sinais de alerta para SD22q11.2 entre pediatras gerais, neonatologistas e cardiologistas pediátricos. Embora a proposta pioneira do Instituto da Criança para detecção de imunodeficiências primárias no primeiro ano de vida, adotada pelo Ministério da Saúde, já incluía 4 sinais associados ao diagnóstico da SD 22q11.2 (CHD, em especial, as anomalias dos vasos da base; linfopenia <2.500/mm³; hipocalcemia com ou sem convulsão e ausência de imagem tímica ao raio-X de tórax)^{31,32} seria importante o estabelecimento de sinais de alerta específicos para essa síndrome, acrescentando-se aos acima descritos as alterações fenotípicas e insuficiência velofaríngea.

No manejo da criança portadora da SD 22q11.2 é necessária a atuação conjunta de equipe multidisciplinar composta por pediatra, cardiologista, geneticista, e eventualmente também de endocrinologista, neurologista, cirurgião plástico, psicólogo e fonoaudiólogo.

Conclusão

Considerando-se que em nosso país nascem 2,5 milhões de crianças/ano pode-se estimar que deveriam ser identificados de 500 a 750 novos casos da SD22q11.2 a cada ano, evidenciando seu subdiagnóstico. Desta maneira é crucial o alerta para o diagnóstico da síndrome, com a valorização da presença de CHD, associada com hipocalcemia, dismorfismos faciais, insuficiência velofaríngea, hipoplasia ou ausência tímica no Rx de tórax, sendo necessária a confirmação diagnóstica pela identificação da microdeleção.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processos 2008/58238-4, 2009/53864-7 e 2009/53105-9. CNPQ processo – 302647/2011-2 e 308105/2012-5 PQ2. NAP CriAd 2012 e 2013. Laboratório Fleury

Referências

1. Gennery AR. Immunological aspects of 22q 11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:17-27.
2. Kobrynski L, Sullivan K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet.* 2007;370:1443- 52.
3. Goldmuntz E. DiGeorge Syndrome: New Insights. *Clin Perinatol.* 2005;32:963-78.
4. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:2934-5. Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes.* 2012 Jan 9;5:13.
6. Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol.* 2010; 11: 1617-24.
7. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res* 2013; 112:707-20. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300853.

8. Porto MH, Birroli MI, Duarte AJ, Carneiro-Sampaio MM. Peripheral lymphocyte subpopulations in selective IgA deficiency. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 1988;43:294-7.
9. Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a housekeeper. *J Clin Immunol*. 2008;28(Suppl 1):S56-61.
10. Carneiro-Sampaio MM, Vasconcelos DM, Kokron CM, Jacob CM, Barros MT, Dorna MB, et al. Primary Immunodeficiency Diseases in Diferente Age Groups: A Report on 1008 Cases from a Single Brazilian Reference Center. *J Clin Immunol*. 2013;33:716-24.
11. Fomin AFB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics (São Paulo)*. 2010;65:865-9.
12. Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat ver Neurosci*. 2010;1:402-16.
13. De la Morena MT, Eitson JL, Dozmorov IM, Belkaya S, Hoover AR, Anguiano E, et al. Signature MicroRNA expression patterns identified in humans with 22q11.2 deletion/DiGeorge syndrome. *Clin Immunol*. 2013;147:11-22.
14. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997;34:798-804.
15. Duke SG, McGuirt WF Jr, Jewett T, Fasano MB. Velocardiofacial syndrome: incidence of immune cytopenias. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126:1141-5.
16. Belangero S, Bellucco F, Kulikowski L, Christofolini D, Cernach M, Melaragno M. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:307-11.
17. Markert ML, Devlin BH, McCarthy EA. Thymus transplantation. *Clin Immunol*. 2010;135:236-46.
18. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011;2:54.
19. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1151:157-66.
20. Aksu G, Genel F, Koturoglu G, Kurugol Z, Kutukçuler N. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2005;47: 19-24.
21. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL et al. Refined characterization and reference values oh the pediatric T- and B- cell compartments. *Clinical Immunol*. 2009;133: 95-107.
22. Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszys G, Daszkowska J, et al. Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr*. 2008;167:1135-40.
23. McDonald-McGinn DM, Kathleen E. Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge Syndrome/ Velocardiofacial Syndrome). *Medicine*. 2011;90:1-18.

24. Rosa RFM, Trevisan P, Koshiyama DB, Pillsa CB, Zens PRG, Varella- Garcia M, et al. Síndrome de deleção 22q11 e cardiopatias congênitas complexas. *Rev Assoc Med Bras.* 2011;57:62-5.
25. Rosa RF, Zen PR, Ricachinevsky CP, Pilla CB, Pereira VL, Roman T, et al. 22q11.2 duplication and congenital heart defects. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:55-7.
26. McDonald R, Dodgen A, Goyal S, Gossett JM, Shinkawa T, Uppu SC et al. Impact of 22q11.2 deletion on the postoperative course of children after cardiac surgery. *Pediatr Cardiol* 2013;34:341-7. doi: 10.1007/s00246-012-0454-x.
27. Pena DJ, Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG, et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011;6:e17063.
28. Sullivan KE. Immunologic issues in VCFS/ chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Prog Pediatr Cardiol.* 2002;15:103-8.
29. Patel K, Akhter J, Kobrynski L, Benjamin Gathmann MA, Davis O, Sullivan KE, et al. International DiGeorge Syndrome Immunodeficiency Consortium. Immunoglobulin deficiencies: the B-lymphocyte side of DiGeorge Syndrome. *J Pediatr.* 2012;161:950-3.
30. Drew LJ, Crabtree GW, Markx S, Stark KL, Chaverneff F, Xu B, Mukai J, Fenelon K, Hsu PK, Gogos JA, Karayiorgou M. The 22q11.2 microdeletion: fifteen years of insights into the genetic and neural complexity of psychiatric disorders. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(3):259-81.
31. Carneiro-Sampaio M, Jacob CM, Leone CR. A proposal of warning signs for primary immunodeficiencies in the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011;22:345-6.
32. 12 sinais de alerta para Imunodeficiências Primárias no 1º anos de vida. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?dtxt=41993. (acesso 26 agosto 2013)

Anexos

Figura 1. Demonstração da deleção na região 22q11.2 **A.** Técnica de FISH. **B.** Técnica de MLPA.

B

Figura 2. Principais cardiopatias dos 47 pacientes com a SD 22q11.2.

Figura 3. A. Pré-escolar com nariz alongado. B. Pré-escolar com fenda palpebral estreita e lábio fino. C. Escolar com face e nariz alongado. D. Fácies típico com fenda palpebral estreita, nariz proeminente, boca com lábios finos.

Figura 4. Principais características fenotípicas dos pacientes com a SD22q11.2. **A.** Fenda palpebral estreita. **B.** Face e/ou nariz alongado nariz alongado. **C.** Lábios finos.

Figura 5. Fotos evolutivas de pacientes com SD22q11.2 em diferentes idades **A.** Recém-nascido com lábios finos e orelhas displásicas, tornando-se mais características as alterações fenotípicas na fase escolar. **B.** Recém-nascido com dismorfismo facial (fácies e nariz alongado, fenda palpebral estreita, lábios finos) **C.** Lactente com fácies e nariz alongado mais evidentes na evolução.

Tabela 1. Cardiopatias congênitas encontradas em 47 pacientes com a SD 22q11.2 e correções cirúrgicas realizadas

Cardiopatias	N(%)	Correções cirúrgicas N(%)
Tetralogia de Fallot	18 (38,3)	16 (88,8)
Comunicação interventricular	10 (21,3)	2 (20,0)
Atresia pulmonar	6 (12,7)	6 (100,0)
Truncus arteriosus	4 (8,5)	4 (100,0)
Interrupção do arco aórtico	4 (8,5)	4 (100,0)
Comunicação interatrial	3 (6,4)	1 (33,3)
Transposição das grandes artérias	1 (2,1)	1 (100,0)
Drenagem anômala venosa sistêmica	1 (2,1)	0 (0)
Total	47 (100)	34 (72,3)

Tabela 2. Características fenotípicas encontradas em 60 pacientes com a SD22q11.2

Características fenotípicas	N(%)
Face alongada	36 (60,0)
Nariz alongado	32 (53,3)
Fenda palpebral estreita	30 (50,0)
Orelhas displásicas com hiperdobramento	29 (48,3)
Lábios finos	25 (41,6)
Dedos alongados	23 (38,3)
Baixa estatura	22 (36,6)
Alterações do palato	15 (25,0)
Anomalias dentárias	13 (21,6)
Estrabismo	10 (16,6)
Pé torto congênito	8 (13,3)

Figura 6. Principais alterações psiquiátricas e comportamentais encontradas nos pacientes com a SD22q11.2.

Gráfico 1. Análise do hemograma e da imunofenotipagem dos pacientes com a SD22q11.2. **A.** N° de linfócitos totais. **B.** N° de CD4⁺. **C.** N° de CD8⁺. **D.** N° de CD19⁺.

Gráfico 2. Análise das imunoglobulinas dos pacientes com a SD22q11.2. **A.** Níveis séricos de IgM. **B.** Níveis séricos de IgG. **C.** Níveis séricos de IgA.

ANEXO G

Artigo submetido: *Orphanet Journal of Rare Diseases*.

Article title: Rare rearrangement in a boy with Williams-Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior
 MS ID : 9742216121322062
 Authors : Roberta L Dutra, Flavia B Piazon, Evelin A Zanardo, Thais VMM Costa, Alexandre T Dias, Marilia M Montenegro, Gil M Novo-filho, Amom M Nascimento, Leslie D Kulikowski and Chong A Kim
 Journal : Orphanet Journal of Rare Diseases

Dear Prof Kulikowski

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

Author's covering letter for initial submission

Title: Rare rearrangement in a boy with Williams-Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior

Version: 1 **Date:** 9 June 2014

Rare rearrangement in a boy with Williams-Beuren syndrome associated to XYY syndrome and intriguing behavior

Dutra, RL²; Piazzon, FB¹; Zanardo, EA²; Costa, TVMM¹; Dias, AT¹; Montenegro, MM^{1,2}; Novo-Filho, GM²; Nascimento, AM²; Kulikowski, LD^{1,2}; Kim, CA^{1,2}

^{1,2}Department of Pathology, Cytogenomics Laboratory, LIM 03, HC-FMUSP, University of São Paulo

²Genetics Unit, Instituto da Criança, HC-FMUSP, University of São Paulo

Abstract

Introduction: Williams-Beuren syndrome (WBS) is caused by a hemizygous contiguous gene microdeletion of 1.55-1.84 Mb at 7q11.23 region. Approximately 28 genes have been shown to contribute to classical phenotype of SWB with presence of dysmorphic facial features, supraaortic stenosis (SVAS), intellectual disability and overfriendliness. With the use of Microarray-based comparative genomic hybridization and other molecular cytogenetic techniques, is possible define with more accuracy partial or atypical deletion and refine the genotype-phenotype correlation. Here, we report a patient with rare genomic structural rearrangement in a boy with atypical deletion in 7q11.23 and XYY syndrome with characteristic clinical signs, but not sufficient for the diagnosis of WBS.

Methods and Results: Cytogenetic analysis of G-banding showed a karyotype 47,XYY. Analysis of DNA with the technique of MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) using kits a combination of

kits (P064, P036, P070 and P029) identified a atypical deletion on 7q11.23. In addition, high resolution SNP Oligonucleotide Microarray Analysis (SNP-array) confirmed the alterations found by MLPA and revealed others pathogenic CNVs, in the chromosomes 7 and X.

Discussion: The present report demonstrates an association not yet described in literature, Williams-Beuren syndrome with 47,XYY. The identification of atypical deletion in 7q11.23 concomitant to additional pathogenic CNVs in others genomic regions allows a better comprehension of etiologic origin in recurrent rearrangements.

Introduction

Copy Number variants or CNVs are the most prevalent types of structural variations in the human genome and result in the alteration of a variable number of genes causing changes in gene dosages (deletions and duplications), which ultimately may lead to population diversity, disease predisposition or specific clinical phenotypes (Redon et al., 2006; Merla et al., 2010).

Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is a neurodevelopmental disorder described independently (Williams et al., 1961; Beuren et al., 1962) as a syndrome involving peculiar facial appearance, supravalvular aortic stenosis (SVAS) and mental retardation. In fact, WBS presents a wide collection of symptoms affecting blood vessels, growth, intelligence, and behavior. Children with this condition have distinctive elfin facial features, a hoarse voice associated with overfriendly personality, growth and mental retardation, hyperacusis, infantile hypercalcemia and prematurely wrinkled skin are also common symptoms (Morris et al., 1988).

WBS is generally sporadic with frequency of approximately 1 in 7,500 live births with no ethnic or sex preference, although familial cases have been reported with apparent autosomal dominant inheritance (Strømme et al., 2002; Morris et al., 1993).

Despite the consistency of the overall clinical features, the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability frequently lead to a significant difference in the number of patients diagnosed (Ashkenas et al., 1996).

WBS is caused by a hemizygous contiguous gene microdeletion of the WBS critical region on chromosome 7 at position 7q11.23. Common deletions in WBS patients span a genomic region of around ~1.55 Mb and some patients present deletions of 1.84 Mb (Peoples et al., 2000; Bayés et al., 2003).

Patients with partial or atypical deletions (approximately 0.2 Mb to ~2.5 Mb) are of extreme importance for genotype - phenotype studies, due the substantial phenotypic variability among WBS. (Frangiskakis et al., 1996; Botta et al., 1999; Tassabehji et al., 1999; Gagliardi et al., 2003; Heller et al., 2003; Hirota et al., 2003; Karmiloff-Smith et al., 2003; Morris et al., 2003; Tassabehji et al., 2005; Howald et al., 2006; Edelmann et al., 2007; van Hagen et al., 2007; Blyth et al., 2008; Dai et al., 2009; Schubert, 2009; Antonell et al., 2010; Ferrero et al., 2010).

Thus, the advent of genomic array technology has lead directly to the appreciation of genomic number copy variation and the elevated complexity of CNVs, called Complex Chromosomal Rearrangements (CCRs) commonly characterized by multiple breakpoints and exchanges interspread with regions of normal copy number (Zhang et al., 2009; Colnaghi et al., 2011).

In this report, we described the first case of the boy with atypical deletion at 7q11.23 interspersed with normal sequence (between two atypical deletions: ~115 kb and 1,2 Mb), along with a chromosome Y supernumerary.

Case presentation

The proband is the first child of a non-consanguineous couple. The pregnancy and delivery were uneventful. Birth weight was less than 3kg and length was not informed. Clinical examination of the patient at 4 years and 6 months revealed normal weight and height, typical facial appearance with broad forehead, puff eyes with stellate irides, flat nasal bridge, short upturned nose, anterior rotated prominent ears, full cheeks, long philtrum, wide mouth with full lips, small and aberrant shape teeth with hypoplastic enamel and no heart anomalies.

His behavior was very intriguing because it oscillates the typical friendly behavior and the attention deficit-hyperactivity disorder with aggressive and destructive impulses what collaborates with the school problems. He has previous history of physical attacks against family and school members.

The proband and their parents signed informed consent forms under protocols approved by the Institutional Review Boards of the Faculty of Medicine - University of São Paulo.

Methods

Karyotype analysis

Lymphocyte cultures were made for karyotype analysis (Moorhead et al., 1960). Twenty metaphases were analyzed for each individual. The metaphase chromosomes, with a 400-550 chromosome band resolution, were classified according to the ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (2005).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

The genomic DNA of the proband and your parents were screened with four MLPA kits: two for subtelomeric imbalances (P036 and P070) and one for the most common microdeletion syndromes (P064) (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Later, we used a specific kit for critical region WBS (P029-B1).

MLPA was carried out according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA (50–500 ng) in 5ul Tris–EDTA was denatured for 5 min at 98°C, cooled to 25°C, and then mixed with the probe set and a high salt buffer. The mixture was heated 1 min at 95°C and incubated 16 h at 60°C for Hybridization and the solution was placed to 54°C. Ligation was performed with the Ligase-65 enzyme for 15 min at 54°C, and inactivated by incubation for 5 min at 98°C. Ten microliters of the ligation product was premixed with 30ul PCR buffer, placed in a thermocycler at 60°C, and 10ul reaction mix was added. PCR was carried out for 35 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 1 min at 72°C, 20 min at 72°C). Electrophoresis was performed using an ABI 3500 Genetic Analyzer, and data were analyzed out using GeneMarker software (Softgenetics, www.softgenetics.com).

Individual peaks corresponding to each exon were identified based on the difference in migration relative to the size standards. The peak area of each fragment was compared with that of a control sample. Salsa P036 was used for screening, and Salsa P070 was used for confirmation. The details of regions detected by each kit can be found at www.mlpa.com. Results were considered abnormal when the relative peak height ratio was below 0.70 or above 1.30.

SNP array analysis

The SNP array used was the CytoScan™ HD Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) composed of 2.6 million markers and 1.8 million non-polymorphic markers probes, using the manufacturer's recommended protocol. The data were analyzed using, Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software.

The UCSC database (hg19) was used to map the genomic coordinates and to find the genes within the copy number altered regions. The CNVs were compared to previously reported studies and were considered putatively benign if they are present as normal polymorphisms in the Database of Genomic Variants (<http://www.projects.tcga.ca/variation/>).

Results

Cytogenetic analysis of the proband showed an additional chromosome Y (47,XYY). The results of MLPA indicated a duplication in subtelomeric region of the sex chromosomes (*SHOX* and *SYBL1* genes) using the SALSA P036-D and P070-E kits. The confirmation of an extra Y occurred by analysis of the controls peaks presents in the MLPA kit.

Using the SALSA P064 kit MLPA, we found an atypical deletion in 7q11.23 region, seen in patients with Williams syndrome. The results showed a partial deletion of the WBS region, comprising the probes: *CYLN2a*; *CYLN2b*; *STX1A*; *ELN* and *LIMK1*. However, the probe *FZD9*, localized in the distal portion was not deleted. The confirmation of atypical deletion in WBS region was performed using a specific kit SALSA P029.

The SNP array results showed an atypical interstitial deletion in the 7q11.23 interspersed with normal sequence (between two atypical deletions: ~115 kb and 1.2 Mb) (Figure 1).

The first deletion spanning approximately 115 kb corresponding to the chromosomal coordinates from (Chr7: 72,569,012-72,685,658). This CNV present only one copy of the genes *LOC100093631*, *GTF2IP1* and *NCF1B*.

The second deletion occurred in the distal region 7q11.23 spanning 1.6 Mb (Chr7: 73,052,174-74,628,459), involving approximately 28 RefSeq genes.

Between this microdeletions, was identified a region intercalary with normal sequence of 370 kb. In this region, eight genes presented normal copy number: *NSUN5*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*. (Figure 1).

Furthermore, it was detected by SNP-array CNV in others genomic region. In the short arm of the chromosome 7, 7p14.3 region, we found a small duplication of 60 Kb (Chr 7: 33,135,610 - 33,193,680), that includes the genes *RP9* and *BBS9*. In addition, the array analysis showed a deletion of the 58 Kb in the 13q31.3 region (Chr 13: 94,579,078 - 94,639,273), located on long arm of chromosome 13, involving the gene *GPC6*.

Finally, the proband presented abnormalities in the subtelomeres of the chromosome X. In the Xq28 region, we found a 335 Kb fragment duplicated (Chr X: 154,997,451-155,240,482) encompassing the genes *SPRY3*, *VAMP7*, *IL9R* and in the Xp22.33 (Chr X: 198,061-2,693,037), also a duplication of 2.3 Mb involving 18 RefSeq genes.

The parental karyotype was normal and MLPA analysis was negative for microdeletion, confirming *de novo* origin of the genomic abnormalities seen in this patient.

Discussion

We report a first case of complex rearrangement in a boy with atypical Williams syndrome associated the presence of chromosome Y extra.

Advances in molecular diagnosis have led to an increase in the number of patients with well-known genetic syndromes but atypical genetic alterations.

Patients with partial or atypical deletions are of extreme importance for genotype/phenotype studies (Figure 2). In the literature, there are reports of patients with partial deletions in the 7q11.23 region and which present a spectrum of WS signs and symptoms, depending on which genes are deleted (Morris 2010).

In our patient, two different deletions occurred in the critical region for WBS. Haploinsufficiency of approximately thirty genes were verified in 7q11.23, except for genes *NSUN5*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*.

BAZ1B have been implicate in craniofacial development. In mouse model, heterozygous L733R change in a highly conserved amino acid generated by random chemical mutagenesis, resulting in reduced protein level compared with wild-type (Ashe et al., 2008).

Moreover, *Baz1b* haploinsufficiency produces some craniofacial features similar to those shown by typical WBS patients, such as a small upturned nose with flat nasal bridge, malocclusion, bitemporal narrowing, and prominent forehead (Ashe et al., 2008; Fusco et al., 2014).

The comparison among the patients with atypical deletions reported previously revealed mild dimorphism facial in cases without alterations for *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B* and *TBL2* genes (Frangiskakis et al., 1996; Botta et al., 1999; Morris et al., 2003; Antonell et al., 2010; Honjo et al., 2012; Euteneuer et al. 2013; Fusco et al., 2014).

On the other hand, individuals with atypical distal deletions also present facial abnormalities, as well as observed in our patient (Heller et al., 2003; Karmiloff-Smith et al., 2003), suggesting that the genes *TBL2*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9* and *BAZ1B* may not be involved of the onset of such phenotypes.

Some authors suggest that the degree variation of craniofacial abnormalities in patients with atypical deletions are caused by genes at both proximal and distal ends of the deletion in 7q11.23, including *GTF2IRD1* and *GTF2I* genes (Ferrero et al., 2010; Delgado et al., 2013).

The absence in our patient of cardiac malformations and others phenotypic aspects for WBS, could be explained by presence of other factors, such as a potential position effect due to different deletion sizes/breakpoints. Genetic variations in non-deleted alleles, or genetic modifiers elsewhere in the genome, also contribute significantly for phenotypic variety in SWB (Delio et al., 2013; Euteneuer et al., 2013).

Furthermore, Merla et al. (2006) suggested that not only hemizygous genes but also normal-copy neighboring genes show decreased relative levels of expression in the patients with SWB.

Challenging behaviours such as aggression do not typically form part of the behavioural phenotype in patients with WBS (Powis and Oliver, 2014). Some authors using animal model propose that decrease of number copy of GTF2i is associated with hypersociability (Sakurai et al., 2011; Malefant et al., 2012). However, our case present typical friendly behavior and the attention deficit-hyperactivity disorder with aggressive and destructive impulses.

Approximately 82% of boys with 47,XYY have symptoms of ADHD, which greatly interfere with academic performance and may lead to aggression and that typically emerges between 2 and 3 years of age. Additionally, males with 47,XYY have been reported to be more disruptive and impulsive, which greatly interferes with their learning skills (Visootsak and Graham, 2009).

Parents have also reported concerns for antisocial behavior, with a significantly increased factor score for “uncontrolled, follows own urges, careless of social rules” when compared to sibling controls (Ratcliffe et al., 1990).

This is not generally known regarding clinical phenotype of individuals with 47,XYY, except tall stature, possibly due to the expression of three copies of the short stature homeobox-containing gene (*SHOX*), which is located on the distal ends of Xp and Yp in the pseudoautosomal region 1 (*PARI*) (Ottesen et al, 2010).

CNVs are the most prevalent types of structural variations in the human genome (Iafrate et al. 2004; Redon et al. 2006; Sebat et al. 2004) causing changes in gene dosages, which ultimately may lead to disease predisposition or specific clinical phenotypes. Moreover, the disruption of regulatory regions within the CNVs can also result into altered dosage and function of genes outside the deleted or duplicated intervals (Henrichsen et al. 2009a; Henrichsen et al. 2009b; Merla et al. 2006).

We also found additional pathogenetic aberrations (deletions in 7p14.3 and 13q31.3, duplication in Xp22.33 and Xq28) might contribute in the patient phenotype, acting as additional modifiers of their clinical manifestations.

In our patient, the increased of the genomic copy number in telomeric region of chromosome X, may favors the stability of excess of genic dosage during the recombination process.

Recent studies suggested that besides the role of the genes in the deleted/duplicated interval, multiple factors such as regulatory sequences, epigenetic mechanisms, parental origin of the CNV, and nucleotide variations in the non-deleted/duplicated allele may be important in determining the variable expressivity of 7q11.23 CNV phenotypes (Merla et al., 2010; Sanders et al., 2011).

Conclusion

This report shows the importance of a deeper investigation of atypical cases of well-known syndromes. Patients with partial or atypical deletions are of extreme importance for genotype-phenotype studies. With the use a combination of molecular techniques, was possible define with more precision the deletion breakpoints and an accurate diagnoses. In addition, several genomic alterations can result in an overlapping phenotype by the “reverse phenotypics” approach, in which a similar genomic aberration precedes the definition of a parallel clinical presentation.

References

- A Botta, G Novelli, A Mari, A Novelli, M Sabani, J Korenberg, L Osborne, M Digilio, A Giannotti, and B Dallapiccola. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *Med Genet.* 1999 June; 36(6): 478–480.
- Aksglaede L, Garn I, Tartaglia N, Tassone F, Gravholt CH, et al. Increased number of sex chromosomes affects height in a *nonlinear fashion: a study of 305 patients with sex chromosome aneuploidy*. *Am J Med Genet A.* 2010, 152:1206-1212.

Antonell A, Del Campo M, Magano LF, Kaufmann L, de la Iglesia JM, Gallastegui F, Flores R, Schweigmann U, Fauth C, Kotzot D, Pérez-Jurado LA. Partial 7q11.23 deletions further implicate GTF2I and GTF2IRD1 as the main genes responsible for the Williams-Beuren syndrome neurocognitive profile. *J Med Genet*. 2010 May;47(5):312-20. doi: 10.1136/jmg.2009.071712. Epub 2009 Nov 5.

Ashe A, Morgan DK, Whitelaw NC et al: A genome-wide screen for modifiers of transgene variegation identifies genes with critical roles in development. *Genome Biol* 2008; 9: R182.

Ashkenas J: Williams syndrome starts making sense. *Am J Hum Genet* 1996, 59:756-761.

Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA: Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 2003, 73:131-151.

Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D: Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation* 1962, 26:1235-1240.

Blyth M, Beal S, Huang S, Crolla J, Foulds N. A novel 2.43 Mb deletion of 7q11.22-q11.23. *Am J Med Genet A*. 2008 Dec 15;146A(24):3206-10. doi: 10.1002/ajmg.a.32584.

Delgado LM1, Gutierrez M, Augello B, Fusco C, Micale L, Merla G, Pastene EA. A 1.3-mb 7q11.23 atypical deletion identified in a cohort of patients with williams-beuren syndrome. *Mol Syndromol*. 2013 Mar;4(3):143-7.

Delio M, Pope K, Wang T, Samanich J, Haldeman-Englert CR, Kaplan P, Shaikh TH, Cai J, Marion RW, Morrow BE, Babcock M. Spectrum of elastin sequence variants and cardiovascular phenotypes in 49 patients with Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Mar;161A(3):527-33.

Ferrero GB, Howald C, Micale L et al: An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams-Beuren syndrome patient. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 33–

Gagliardi C, Bonaglia MC, Selicorni A, Borgatti R, Giorda R: Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. *J Med Genet* 2003, 40:526-30.

Heller R, Rauch A, Luttgen S, Schroder B, Winterpacht A: Partial deletion of the critical 1.5Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet* 2003; 40: e99.

Heller R, Rauch A, Lüttgen S, Schröder B, Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet*. 2003 Aug;40(8):e99.

Hirota H, Matsuoka R, Chen XN, Salandanan LS, Lincoln A, Rose FE, Sunahara M, Osawa M, Bellugi U, Korenberg JR Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. *Genet Med*. 2003 Jul-Aug;5(4):311-21.

Honjo RS, Dutra RL, Nunes MM, Gomy I, Kulikowski LD, Jehee FS, Kim CA. Atypical deletion in Williams-Beuren syndrome critical region detected by MLPA in a patient with supravalvular aortic stenosis and learning difficulty. *J Genet Genomics*. 2012 Oct

Howald C, Merla G, Digilio MC, Amenta S, Lyle R, Deutsch S, Choudhury U, Bottani A, Antonarakis SE, Fryssira H, Dallapiccola B, Reymond A. Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. *J Med Genet*. 2006 Mar;43(3):266-73. Epub 2005 Jul 1.

Malenfant P, Liu X, Hudson ML, Qiao Y, Hrynychak M, Riendeau N, Hildebrand MJ, Cohen IL, Chudley AE, Forster-Gibson C, Mickelson EC, Rajcan-Separovic E, Lewis ME, Holden JJ. Association of GTF2i in the Williams-Beuren syndrome critical region with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2012 Jul;42(7):1459-69.

Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C: Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet* 2010, 128(1):3-26

Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960, 20: 613-616.

Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL: Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr* 1988, 113:318-326.

Morris CA, Thomas IT, Greenberg F: Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 1993, 47:478-481.

Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ, Sommer A, Moore CA, Hopkin RJ, Spallone PA, Keating MT, Osborne L, Kimberley KW, Stock AD. GTF2I hemizygosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A*. 2003 Nov 15;123A(1):45-59.

Peoples R, Franke Y, Wang YK, Pérez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Francke U: A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome-deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 2000, 66:47-68.

Powis L1, Oliver C2. The prevalence of aggression in genetic syndromes: a review. *Res Dev Disabil*. 2014 May;35(5):1051-71.

Ratcliffe SG, Butler GE, Jones M. 1990. Edinburgh study of growth and development of children with sex chromosome abnormalities. In: Evans JA, Hamerton JL, Robinson A, editors. *Children and young adults with sex chromosome aneuploidy*. New York: Wiley Liss (for the National Foundation, March of Dimes, New York: Birth Defects: Original Article Series), Vol. 26. p 1–44.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W: Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006, 444 (7118):444-54.

Sakurai T, Dorr NP, Takahashi N, McInnes LA, Elder GA, Buxbaum JD. Haploinsufficiency of Gtf2i, a gene deleted in Williams Syndrome, leads to increases in social interactions. *Autism Res*. 2011 Feb;4(1):28-39.

Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011, 70:863-885

Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K: Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002, 17:269-271.

Tassabehji M: Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (Spec No 2): R229–R237.

Tassabehji M, Carette M, Wilmot C, Donnai D, Read AP, Metcalfe K. A transcription factor involved in skeletal muscle gene expression is deleted in patients with Williams syndrome. *Eur J Hum Genet*. 1999 Oct-Nov;7(7):737-47.

Visootsak J, Graham JM Jr. Social function in multiple X and Y chromosome disorders: XXY, XYY, XXYY, XXXY. *Dev Disabil Res Rev.* 2009, 15:328-332.

Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB: Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 1961, 24:1311-1318.

Zhang F, Carvalho CMB, Lupski JR. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 2009;25:298–307.

Figures and Legends

Figure 1. Cytogenomic analysis of the proband showing the MLPA and SNP-array results. The confirmation of atypical deletion in WBS region was performed using a specific kit SALSA P029. The SNP array results showed an atypical interstitial deletion in the 7q11.23 interspersed with normal sequence (between two atypical deletions: ~115 kb and 1.2 Mb).

Figure 2. Ideogram of chromosome 7 showing the genes and different sizes of deletion in the 7q11.23 region compared with the literature.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2011 Aug;159(2):332-9 e1.

Behjati F, Firouzabadi SG, Sajedi F, Kahrizi K, Najafi M, Ghasemlou BE, et al. Identification of Chromosome Abnormalities in Subtelomeric Regions Using Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) Technique in 100 Iranian Patients With Idiopathic Mental Retardation. *Iran Red Crescent Me*. 2013 Oct;15(10).

Boggula VR, Shukla A, Danda S, Hariharan SV, Nampoothiri S, Kumar R, et al. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. *Indian J Med Res*. 2014 Jan;139(1):66-75.

Bui TH, Blennow E, Nordenskjold M. Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002 Oct;16(5):629-43.

Castiglione A, Guaran V, Astolfi L, Orioli E, Zeri G, Gemmati D, et al. Karyotype-phenotype correlation in partial trisomies of the short arm of chromosome 6: a family case report and review of the literature. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141(4):243-59.

Cirillo E, Giardino G, Gallo V, Puliafito P, Azzari C, Bacchetta R, et al. Intergenerational and intrafamilial phenotypic variability in 22q11.2 deletion syndrome subjects. *BMC Med Genet*. 2014;15:1.

Colnaghi R, Carpenter G, Volker M, O'Driscoll M. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Oct;22(8):875-85.

Derwinska K, Bartnik M, Wisniowiecka-Kowalnik B, Jagla M, Rudzinski A, Pietrzyk JJ, et al. Assessment of the role of copy-number variants in 150 patients with congenital heart defects. *Med Wieku Rozwoj*. 2012 Jul-Sep;16(3):175-82.

Draaken M, Baudisch F, Timmermann B, Kuhl H, Kerick M, Proske J, et al. Classic bladder exstrophy: Frequent 22q11.21 duplications and definition of a 414 kb phenocritical region. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014 Apr 25.

Faas BHW, Cirigliano V, Bui TH. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonat M*. 2011 Apr;16(2):81-7.

Feenstra I, Brunner HG, van Ravenswaaij CMA. Cytogenetic genotype-phenotype studies: Improving genotyping, phenotyping and data storage. *Cytogenetic and Genome Research*. 2006;115(3-4):231-9.

Fusco C, Micale L, Augello B, Pellico MT, Menghini D, Alfieri P, et al. Smaller and larger deletions of the Williams Beuren syndrome region implicate genes involved in mild facial phenotype, epilepsy and autistic traits. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jan;22(1):64-70.

Gao S, Li X, Amendt BA. Understanding the Role of Tbx1 as a Candidate Gene for 22q11.2 Deletion Syndrome. *Curr Allergy Asthm R*. 2013 Dec;13(6):613-21.

Gonzalez Alvaredo S, Sanz Rojo R, Garcia Santiago J, Gaztanaga Exposito R, Bengoa A, Perez-Yarza EG. [Genetic diagnostic criteria in cases of mental retardation and development of idiopathic origin]. *An Pediatr (Barc)*. 2008 Nov;69(5):446-53.

Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol*. 2008 Sep;56(6):345-53.

Guilherme RS, Kim CA, Alonso LG, Honjo RS, Meloni VA, Christofolini DM, et al. Ring chromosome 10: report on two patients and review of the literature. *J Appl Genet*. 2013 Feb;54(1):35-41.

Hasse JM. Developing the "write" skills for publishing. *Nutr Clin Pract*. 2013 Apr;28(2):153-7.

Hila L, Tebourbi H, Abaied L, Rejeb I, Ben Jemaa L, Chaabouni H. MLPA Subtelomere Analysis in Tunisian Mentally Retarded Patients. *Biochem Genet*. 2009 Oct;47(9-10):727-33.

Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009 Jul-Aug;52(4):161-9.

Jain S, Chowdhury V, Juneja M, Kabra M, Pandey S, Singh A, et al. Intellectual disability in Indian children: experience with a stratified approach for etiological diagnosis. *Indian Pediatr*. 2013 Dec;50(12):1125-30.

Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PFV, Pordeus ACB, Latini FRM, Bertola DR, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet*. 2011 Jul-Aug;54(4):E425-E32.

John N, Rajasekhar M, Girisha KM, Sharma PS, Gopinath PM. Multiplex ligation-dependant probe amplification study of children with idiopathic mental retardation in South India. *Indian J Hum Genet.* 2013 Apr;19(2):165-70.

Jones CH, Gawronski MJ. The genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Progress in Pediatric Cardiology.* 2002;15(2):99-101.

Jones MJ, Jallepalli PV. Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Dev Cell.* 2012 Nov 13;23(5):908-17.

Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007 Jan-Feb;50(1):33-42.

Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Oya H, Kato S. Williams syndrome is an epigenome-regulator disease. *Endocr J.* 2011 Feb;58(2):77-85.

Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet.* 2007 Oct 20;370(9596):1443-52.

Konialis C, Hagrefelt B, Sevastidou S, Karapanou S, Pispili K, Markaki A, et al. Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal panel in routine prenatal diagnosis. *Prenatal Diag.* 2011 Jun;31(6):571-7.

Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008 Dec;29(23):4627-36.

Liang JS, Shimojima K, Yamamoto T. Application of array-based comparative genome hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatr Neonatol.* 2008 Dec;49(6):213-7.

Medina A, Pineros L, Arteaga C, Velasco H, Izquierdo A, Giraldo A, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia. *Pediatr Neurol.* 2014 Mar;50(3):250-4.

Merla G, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot MT, et al. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet.* 2006 Aug;79(2):332-41.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, 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 May 14;86(5):749-64.

Moeschler JB. Genetic evaluation of intellectual disabilities. *Semin Pediatr Neurol*. 2008 Mar;15(1):2-9.

Monfort S, Orellana C, Oltra S, Rosello M, Guitart M, Martinez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med*. 2006 Jun;147(6):295-300.

Monteiro FP, Vieira TP, Sgardioli IC, Molck MC, Damiano AP, Souza J, et al. Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphic evaluation of 194 individuals and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 2013 Jul;172(7):927-45.

Mundhofir FE, Nillesen WM, Van Bon BW, Smeets D, Pfundt R, van de Ven-Schobers G, et al. Subtelomeric chromosomal rearrangements in a large cohort of unexplained intellectually disabled individuals in Indonesia: A clinical and molecular study. *Indian J Hum Genet*. 2013 Apr;19(2):171-8.

Navon D, Shwed U. The chromosome 22q11.2 deletion: From the unification of biomedical fields to a new kind of genetic condition. *Soc Sci Med*. 2012 Nov;75(9):1633-41.

Onishi-Seebacher M, Korbel JO. Challenges in studying genomic structural variant formation mechanisms: The short-read dilemma and beyond. *Bioessays*. 2011 Nov;33(11):840-50.

Pebrel-Richard C, Kemeny S, Gouas L, Eymard-Pierre E, Blanc N, Francannet C, et al. An atypical 0.8 Mb inherited duplication of 22q11.2 associated with psychomotor impairment. *Eur J Med Genet*. 2012 Nov;55(11):650-5.

Pelegriño KD, Sugayama S, Catelani AL, Lezirovitz K, Kok F, Chauffaille MD. 7q36 deletion and 9p22 duplication: effects of a double imbalance. *Mol Cytogenet*. 2013 Jan 15;6.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update*. 2011 Jul-Aug;17(4):476-94.

Philippe A, Malan V, Jacquemont ML, Boddaert N, Bonnefont JP, Odent S, et al. Xq25 duplications encompassing GRIA3 and STAG2 genes in two families convey recognizable X-linked intellectual disability with distinctive facial appearance. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun;161A(6):1370-5.

Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2013;6(1):7.

Portnoi MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet*. 2009 Mar-Jun;52(2-3):88-93.

Preiksaitiene E, Mannik K, Dirse V, Utkus A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, et al. A novel de novo 1.8 Mb microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. *Eur J Med Genet*. 2012 Nov;55(11):656-9.

Qiao Y, Tyson C, Hrynychak M, Lopez-Rangel E, Hildebrand J, Martell S, et al. Clinical application of 2.7M Cytogenetics array for CNV detection in subjects with idiopathic autism and/or intellectual disability. *Clin Genet*. 2013 Feb;83(2):145-54.

Rafati M, Ghadirzadeh MR, Heshmati Y, Adibi H, Keihanidoust Z, Eshraghian MR, et al. "Familial" versus "sporadic" intellectual disability: contribution of subtelomeric rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2012;5(1):4.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006 Oct 1;140A(19):2063-74.

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: A comparison of detection methods. *Hum Mutat*. 2005 Jun;25(6):513-24.

Schluth-Bolard C, Till M, Edery P, Sanlaville D. [New chromosomal syndromes]. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Sep;56(6):380-7.

Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007 Nov 15;145C(4):335-45.

Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C*. 2007 Feb 15;145C(1):87-98.

Shevell M. Global developmental delay and mental retardation or intellectual disability: conceptualization, evaluation, and etiology. *Pediatr Clin North Am*. 2008 Oct;55(5):1071-84, xi.

Shevell MI. The evaluation of the child with a global developmental delay. *Semin Pediatr Neurol*. 1998 Mar;5(1):21-6.

Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of subspecialists' evaluation of young children with global developmental delay. *J Pediatr*. 2000 May;136(5):593-8.

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

Silove N, Collins F, Ellaway C. Update on the investigation of children with delayed development. *J Paediatr Child Health*. 2013 Jul;49(7):519-25.

Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Jun;17(3):182-92.

Stegmann APA, Jonker LMH, Engelen J. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet*. 2008 Mar-Apr;51(2):93-105.

Strehle EM, Gruszfeld D, Schenk D, Mehta SG, Simoncic I, Huang TS. The spectrum of 4q-syndrome illustrated by a case series. *Gene*. 2012 Sep 15;506(2):387-91.

Tirosch E, Jaffe M. Global developmental delay and mental retardation--a pediatric perspective. *Dev Disabil Res Rev*. 2011 Nov;17(2):85-92.

Weisfeld-Adams JD, Edelmann L, Gadi IK, Mehta L. Phenotypic heterogeneity in a family with a small atypical microduplication of chromosome 22q11.2 involving TBX1. *Eur J Med Genet*. 2012 Dec;55(12):732-6.

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

Zhang CZ, Leibowitz ML, Pellman D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes Dev*. 2013 Dec 1;27(23):2513-30.