Évelin Aline Zanardo

**Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de
pacientes com malformações congênitas e atraso do
desenvolvimento neuropsicomotor**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo

2014

Évelin Aline Zanardo

**Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de
pacientes com malformações congênitas e atraso do
desenvolvimento neuropsicomotor**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski

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

Zanardo, Évelin Aline

Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor / Évelin Aline Zanardo. -- São Paulo, 2014.

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

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Anormalidades congênitas 2.Deficiências do desenvolvimento 3.Variações do número de cópias de DNA 4.Técnicas de diagnóstico molecular 5.Hibridização in situ fluorescente 6.Reação em cadeia da polimerase multiplex 7.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/DBD-398/14

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho aos meus
pais, Carlos e Márcia e à
minha irmã Rafa...***

*Que nesse período também aprenderam sobre
citogenômica, leram e opinaram na escrita da
dissertação, assistiram diversas vezes minha aula e
ajudaram muito, principalmente psicologicamente,
para que este trabalho fosse concluído. Portanto meu
mestrado é dedicado com muito carinho a essas
pessoas incríveis, que eu amo muito...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus pais, **Carlos e Márcia**, pelo apoio, dedicação e amor. Agradeço por sempre me incentivar a estudar, me aconselhar nos momentos difíceis e por compreender os momentos da minha ausência.

À minha irmã, **Rafaela**, pelos momentos de alegrias, apelidos “carinhosos”, críticas e sugestões, e pelo companheirismo.

À minha querida orientadora, **Dra. Leslie Domenici Kulikowski**, pela confiança e contribuição para meu crescimento profissional e pessoal. Sua dedicação e amor pela pesquisa é exemplo admirável de profissional. Obrigada pelos conselhos, otimismo e amizade.

À **Prof. Dra. Chong Ae Kim** pela dedicação à genética clínica e aos pacientes, orientação e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos amigos **Roberta Lelis Dutra, Alexandre Torchio Dias, Marília Moreira Montenegro e Gil Monteiro Novo Filho**, pela grande amizade, risadas, conselhos e ensinamentos. Iniciamos esta jornada juntos, trabalhando com muita dedicação, união e companheirismo. Obrigada pelas histórias, incentivos e momentos de distração.

À amiga **Flavia Balbo Piazzon** pelos ensinamentos clínicos e às viagens divertidas para Piracicaba para a realização de grande parte deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Citogenômica, **Thaís V. Moura M. Costa, Amom Mendes Nascimento, Cíntia Milani, Fabrícia Madia**, pelo apoio, momentos de risadas e todo auxílio experimental e intelectual.

Aos alunos e estagiários, **Fernanda Inácia de Abreu, Andreza Fonseca Amorim, Yanca Gasparini, Mariana Rocha, Fabio Augusto Souto Lopes, Camila Oliveira dos Santos, Aline Cristina Zandoná Teixeira, Cecília Chabel, Mariana de Mello Basso, Natália Fernandes, Mayra Souza e Caroline Cerri Negretto**, por toda colaboração.

Aos médicos da Unidade de Genética Instituto da Criança, **Rachel Sayuri Honjo Kawahira, Débora Romeo Bertola, Israel Gomy, Caio Robledo D. C. Quaio, Mariana de Carvalho Moreira, Guilherme Lopes Yamamoto, Ellaine Doris Carvalho, Tatiana Ferreira de Almeida, Stephanie Pucci Pegler, Larissa Sampaio de Athayde Costa, Diogo C. Q. Soares**, pelo atendimento aos pacientes, além do aprendizado clínico e colaboração para este trabalho.

Ao pesquisador **Daniel de A. M. M. Silvestre**, do Laboratório de Informática Médica (LIM 01), pelo auxílio com as análises de bioinformática.

Às amigas **Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca e Ana Carolina Dias Teixeira** pelo carinho, amizade, momentos alegres e auxílio nas técnicas moleculares.

Ao **Laboratório de Imunologia – LIM 19 (InCor)**, principalmente à **Raquel Alencar** pela amizade e disponibilidade de auxílio nas reações de eletroforese capilar.

Ao **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ-USP, e ao **Ricardo Brassaloti e Gustavo Gasparin** pela ajuda e dedicação na execução na técnica de *array*.

À toda a equipe do **Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP** e à **Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno**, por toda colaboração e auxílio no desenvolvimento das técnicas citogenômicas.

Ao **Laboratório de Citogenética e Genômica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra** – Portugal pelo auxílio para a realização da técnica de *array*-CGH.

Ao **Laboratório de Genômica Pediátrica – LIM 36 (FMUSP)** pela colaboração para a realização dos experimentos citogenômicos.

Aos **funcionários e alunos dos LIMs 03 e 36**, e às **secretárias do programa de Pediatria**, que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos coordenadores do Laboratório de Pediatria Clínica, **Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro Sampaio e Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho**, pela colaboração para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte** e ao **departamento de Patologia da FMUSP** pela colaboração para o desenvolvimento deste estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pelo auxílio financeiro (bolsa de estudo de mestrado).

À todos os **meus familiares**, pelo apoio e compreensão da minha ausência.

Aos **amigos da academia (“terapia”)** pelas palavras de incentivos, apoio emocional e momentos de distrações.

À todos que me incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Se enxerguei mais longe, foi porque
estava sobre os ombros de gigantes”*

- Isaac Newton

*“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”*

- Marthin Luther King

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

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

SUMÁRIO

LISTAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE GRÁFICOS.....	17
LISTA DE QUADROS.....	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Alterações genômicas.....	25
1.2. Métodos de detecção de alterações submicroscópicas.....	28
1.2.1. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	30
1.2.2. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA).....	31
1.2.3. <i>Array</i> (<i>Chromosomal Microarray Analysis</i> - CMA) ou triagem do genoma completo.....	33
1.3. Método mais indicado para o diagnóstico molecular.....	34
2. OBJETIVOS.....	36
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
3.1. Casuística.....	39
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Coleta da amostra.....	40
3.2.2. Cultura de linfócitos de sangue periférico.....	40
3.2.3. Isolamento e quantificação de DNA.....	42
3.2.4. Técnicas avaliadas.....	43
3.2.4.1. Técnica de hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	43
3.2.4.2. Técnica de <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	45
3.2.4.3. Técnica de <i>array</i>	57
3.2.5. Análise final dos dados.....	64
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Resultados pela técnica de FISH.....	69
4.2. Resultados pela técnica de MLPA.....	70
4.3. Resultados pela técnica de <i>array</i>	76
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES.....	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8. ANEXOS.....	99

ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.....	100
ANEXO B - Imagens representativas das sondas utilizadas na técnica de FISH.....	101
ANEXO C - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P064 da MLPA.....	104
ANEXO D - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P036 da MLPA.....	106
ANEXO E - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P070 da MLPA.....	108
ANEXO F - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P250 da MLPA.....	110
ANEXO G - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P356 da MLPA.....	112
ANEXO H - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P029 da MLPA.....	114
ANEXO I - Quadro da comparação das técnicas citogenômicas.....	115
ANEXO J - Quadro dos resultados da técnica de <i>array</i>	121
ANEXO K - Fluxograma do direcionamento de realização dos testes citogenômicos.....	125
9. REFERÊNCIAS.....	126
10. APÊNDICES.....	135

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da classificação das CNVs.....	27
Figura 2 - Modelo de constituição da sonda da MLPA.....	46
Figura 3 - Etapas do método de MLPA.....	49
Figura 4 - Página do <i>software</i> de análise <i>GeneMarker</i> [®] e modelo de seleção de dados para início da análise dos resultados.....	54
Figura 5 - Relatório de análise da MLPA gerado pelo <i>software GeneMarker</i> [®]	56
Figura 6 - Fluxograma dos resultados obtidos a partir da comparação das técnicas citogenômicas.....	68
Figura 7 - Fluxograma com os resultados normais e alterados visualizados por meio da técnica de FISH.....	70
Figura 8 - Fluxograma representando todos os resultados obtidos na técnica de MLPA utilizando diversos <i>kits</i>	75
Figura 9 - Fluxograma da classificação dos resultados obtidos na avaliação por meio da técnica de <i>array</i>	81
Figura 10 - Fluxograma do direcionamento de realização dos testes citogenômicos.....	125

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados obtidos na comparação das técnicas citogenômicas avaliadas (FISH, MLPA e <i>array</i>).....	68
Gráfico 2 - Resultados obtidos por meio da técnica de MLPA utilizando diversos <i>kits</i>	71
Gráfico 3 - Resultados alterados na avaliação por meio da técnica de MLPA utilizando diversos <i>kits</i>	75
Gráfico 4 - Avaliação de 78 pacientes por meio da técnica de <i>array</i> utilizando diversas plataformas.....	76
Gráfico 5 - Resultados normais e alterados obtidos por meio da avaliação da técnica de <i>array</i>	77
Gráfico 6 - Classificação dos resultados obtidos por meio da técnica de <i>array</i>	78
Gráfico 7 - Resultados obtidos por meio da técnica de <i>array</i>	79
Gráfico 8 - Distribuição em porcentagem da quantidade CNVs patogênicas identificadas nos pacientes por meio da técnica de <i>array</i>	80
Gráfico 9 - Tamanho das CNVs encontradas na técnica de <i>array</i>	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Bancos de dados disponíveis para análise de dados de CNVs....	26
Quadro 2 - Sondas da FISH utilizadas neste estudo.....	44
Quadro 3 - Regiões pesquisadas na MLPA pelo <i>kit</i> P064.....	48
Quadro 4 - Componentes do <i>kit</i> de MLPA.....	51
Quadro 5 - Temperatura e tempo utilizados no termociclador para a reação de MLPA.....	51
Quadro 6 - Parâmetros de corrida necessários para a análise de fragmento no equipamento de eletroforese capilar ABI 3500.....	52
Quadro 7 - Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e <i>array</i>	115
Quadro 8 - Resultados da técnica de <i>array</i>	121
Quadro 9 - Resultados obtidos por meio da técnica de FISH.....	70
Quadro 10 - Resultados alterados na avaliação do <i>kit</i> P064 por meio da técnica da MLPA.....	72
Quadro 11 - Resultados alterados na avaliação subtelomérica (<i>kits</i> P036 e P070) por meio da técnica da MLPA.....	73
Quadro 12 - Resultados alterados em ambos os <i>kits</i> P064 e P036 e P070 da MLPA.....	74

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Zanardo, EA. *Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O genoma humano é composto por diversos tipos de variações estruturais, como por exemplo, as variações no número de cópias (CNVs), que, mesmo sendo muito pequenas, podem gerar diversas alterações clínicas específicas, como as malformações congênitas e o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (MC/ADNPM). Para a detecção destas alterações existem diferentes técnicas citogenômicas dentre elas a FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) e a MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que investigam um número limitado de regiões do genoma, como as regiões envolvidas nas síndromes de microdeleções/microduplicações mais comuns e as regiões subteloméricas. Outros métodos como a cariotipagem clássica e o *array* genômico possibilitam uma análise completa do DNA em uma única reação, aumentando a taxa de detecção de desequilíbrios complexos. Alcançar um diagnóstico inequívoco é fundamental para entender a natureza da doença, fornecendo respostas sobre o prognóstico, sobre 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. O projeto teve como objetivo comparar a capacidade diagnóstica destas tecnologias (FISH, MLPA e *array*) para a elucidação etiológica de pacientes sindrômicos encaminhados para a unidade de genética. A casuística deste trabalho foi composta pela análise dos resultados das técnicas de FISH e/ou MLPA e *array*, utilizadas no diagnóstico de 78 pacientes com MC/ADNPM. Na técnica de FISH, empregada na análise genômica de 22 pacientes, foram utilizadas sondas *locus* específicas para as regiões das principais síndromes de microdeleção/microduplicação e para as regiões subteloméricas de cromossomos específicos. Por meio desta metodologia, foram identificados ~18,2% dos pacientes com diferentes alterações. Já a técnica de MLPA, utilizada no diagnóstico dos 78 pacientes, por meio dos *kits* para as principais síndromes

de microdeleção/microduplicação e para as regiões subteloméricas, detectou ~34,6% de pacientes com diversas alterações. A técnica de *array*, realizada em todos os pacientes utilizando diferentes plataformas (*Agilent*, *Affymetrix* ou *Illumina*) apresentou uma taxa de ~42,3% de detecção de pacientes com pelo menos uma alteração patogênica e ~38,5% de pacientes com alterações benignas ou de significado clínico incerto. Ao avaliar as três técnicas concomitantemente foi verificada uma taxa de ~93,6% de concordância, apesar dos resultados não serem iguais em todos os casos e da técnica de MLPA não detectar ~66,2% das alterações em relação ao *array*. Os resultados obtidos corroboraram com dados da literatura, mas no geral a taxa de detecção foi superior às taxas descritas, o em que em parte pode ser devido ao critério de seleção dos pacientes, sugerindo fortemente que a hipótese clínica adequada é crucial para o sucesso da detecção de alteração. Embora o *array* seja a ferramenta mais eficiente para o diagnóstico de pacientes com malformações, seu uso como primeiro teste diagnóstico nem sempre é o mais apropriado devido ao seu custo elevado ou sua limitação em detectar inversões e translocações balanceadas. Portanto todas as técnicas estudadas têm suas vantagens e desvantagens, e poderão ser aplicadas em conjunto para que o diagnóstico molecular seja concluído. Dessa forma, são necessárias uma interação clínico-laboratorial e uma equipe técnica multiprofissional especializada para o direcionamento do diagnóstico molecular mais eficaz em relação ao custo-benefício.

Descritores: Malformações congênitas; Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; FISH; MLPA; *Array*.

ABSTRACT

Zanardo, EA. *Assessment of cytogenomics methods for diagnosis of patients with congenital malformations and developmental delay* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

The human genome is composed of several types of structural variations, such as copy number variation (CNVs) which, although very small, can generate several specific clinical abnormalities, such as congenital malformations and developmental delay (CM/DD). To detect these changes there are different cytogenomics techniques, among them, FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) and MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) that can investigate a limited number of genomic regions for example the most common microdeletion/microduplications syndromes and subtelomeric regions. Other methods such as classical karyotyping and array provide a complete DNA analysis in a single reaction, increasing the detection rate of complex imbalances. Acquire an unequivocal diagnosis is critical to understand the nature of the disease, providing answers about the prognosis, risks of recurrence and directing the patients to specific therapy, which can minimize the cost of these diseases and even allow the inclusion of these individuals in society. The objective of this project was to compare the diagnostic ability of these technologies (FISH, MLPA and array) for the etiologic diagnosis of syndromic patients referred to the clinical unit of genetics. The casuistry was composed by the results of analysis of 78 patients with CM/DD using FISH and/or MLPA and array. The FISH technique was utilized in genomic analysis for 22 patients and locus specific probes were used for regions of the microdeletion/microduplication syndromes and the subtelomeric regions of specific chromosomes. By this methodology ~18.2% of the patients were identified with different genomic changes. The MLPA technique was used in the diagnosis of 78 patients, with microdeletion/microduplication syndrome and subtelomeric regions, and detected ~34.6% of patients with several changes. The array technique was performed in all patients using different platforms (*Agilent*, *Illumina* or *Affymetrix*) and shows a rate of ~42.3% of detection at least one pathogenic change and ~38.5% of patients with benign or

uncertain clinical significance changes. In assessment of the three techniques concomitantly was observed a rate of ~93.6% of concordance, although the results are not the same in all cases and the MLPA technique to detect ~ 66.2% of the changes in relation to the array. The results obtained corroborated with literature data, but the overall detection rate was higher than the rates described in the literature, due in part to the criteria selection of patients. Our results strongly suggesting that appropriate clinical hypothesis is crucial for successful change detection. Although the array is the most efficient tool for the diagnosis of patients with abnormalities, using this test as a first diagnostic approach is not always the most suitable tool because of the high cost or the limitation to detect inversions and balanced translocations. Therefore, all techniques studied have their advantages and disadvantages, and could be applied together for the completed molecular diagnosis. Thus, a clinical laboratory interaction and multidisciplinary skilled technicians is required for targeting the most effective molecular diagnosis in relation to cost-benefit.

Descriptors: Congenital malformations; Developmental delay; FISH; MLPA; Array.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alterações genômicas

No genoma humano existem diferentes variações estruturais, que contribuem para a diversidade genética e susceptibilidade à doença, podendo então estar associadas ou não a alterações clínicas específicas (Marenne et al., 2011). Dentre as variações estão as CNVs (do inglês, *Copy Number Variation*), que inclui deleções e duplicações, as quais variam de aproximadamente 50 pares de bases a muitos megabases de comprimento [as CNVs de 50 pb a 1 kb são consideradas *InDels*: *IN*sertions (inserções) e *DE*letions (deleções) de nucleotídeos nas fitas do DNA de um indivíduo] (Emanuel e Saitta, 2007; Lee et al., 2007; Connolly et al., 2014).

As CNVs são geralmente herdadas e sua frequência varia dependendo do tamanho considerado na alteração, mas estimativas sugerem que mais de 12% do genoma de qualquer indivíduo pode envolver alterações em número de cópias, ou seja, indivíduos normais e saudáveis também são portadores de CNVs (Redon et al., 2006; Kozłowski et al., 2008; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Connolly et al., 2014). Até o presente momento já foram descritas mais de 100.000 CNVs, únicas, no genoma, sendo que a maioria delas é classificada como sendo variações benignas (Connolly et al., 2014).

Diferentes ferramentas podem ser utilizadas para investigar as CNVs no genoma, determinando os pontos de quebra e avaliando o número de cópias presentes por indivíduo (Marenne et al., 2011). Dessa forma, podemos classificar as CNVs relacionando-as com as características fenotípicas do paciente e com as informações reunidas em diversos bancos de dados, como por exemplo, o *Database of Genomic Variants* (DGV), no qual relata variantes estruturais descritas em indivíduos saudáveis, e o *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER), que lista alterações genômicas associadas a um fenótipo clínico, dentre outros bancos de

dados (Quadro 1) (Edelmann e Hirschhorn, 2009; Connolly et al., 2014).

Quadro 1 – Bancos de dados disponíveis na internet para análise de dados de CNVs

Banco de dados	Endereço eletrônico	Propósito
<i>Database of Genomic Variants (DGV)</i>	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home	Banco de dados de variantes benignas
<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER)</i>	http://decipher.sanger.ac.uk/	Banco de dados de variantes em afetados. Inclui fenótipo associado a cada alteração
<i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (EUCARUCA)</i>	http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp	
<i>The International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA)</i>	https://www.iscaconsortium.org/	
<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI), inclui Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) e PubMed</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Banco de dados citogenômicos geral. Contém localização de genes, sondas, SNPs, variantes, etc.
<i>UCSC Genome Browser</i>	http://genome.ucsc.edu/	
<i>Ensembl Genome Browser</i>	http://www.ensembl.org/index.html	

FONTE: Kulikowski et al., 2013.

Até o momento são atribuídas, de uma maneira geral, três interpretações e classificações para as CNVs: as possivelmente benignas ou polimórficas, as patogênicas ou clinicamente relevantes, e as de significado clínico incerto - VOUS (do inglês, *Variants of Uncertain Clinical Significance*). Estas denominações são atribuídas de acordo com as características das CNVs, como por exemplo, se é herdada ou ocorre *de novo*, se está presente em um indivíduo igualmente afetado ou saudável, se é uma região que apresenta muitos ou poucos genes, se é uma deleção ou duplicação, seu tamanho, dentre outras características (Figura 1) (Miller et al., 2010; Hanemaaijer et al., 2012; Vermeesch et al., 2012).

Figura 1 – Fluxograma da classificação das CNVs. As alterações de número de cópias são classificadas como benignas, patogênicas ou VOUS de acordo com as características da sua localização e conteúdo genômico

NOTA: MC/ADNPM: malformações congênitas/atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; CNV: variação do número de cópias; VOUS: variantes de significado clínico incerto.

As CNVs consideradas benignas são alterações que podem ocorrer em regiões com poucos genes, porém elas devem ser do mesmo tipo (ganho ou perda) e observadas em mais de 1% dos indivíduos considerados normais ou relatadas no banco de dados de variantes benignas pelo menos três vezes, em distintas referências. Além disso, também podem ser alterações herdadas de um dos pais, quando este não apresenta alterações clínicas.

Já as CNVs classificadas como patogênicas são as alterações que foram previamente descritas associadas a uma síndrome de microdeleção/microduplicação específica. Elas estão relacionadas às grandes alterações e regiões ricas em genes, e já foram relatadas em pacientes fenotipicamente alterados ou são herdadas de um dos pais que apresentam fenótipo clínico relevante.

E a última categoria para interpretação das CNVs são as VOUS, nas quais envolvem alterações em genes que não apresentam uma função bem estabelecida. Estas CNVs são alterações já descritas em pacientes considerados normais e em pacientes fenotipicamente alterados, ou alterações que não foram descritas previamente (Koolen et al., 2009; Miller et al., 2010; Hanemaaijer et al., 2012; Vermeesch et al., 2012;).

Essas anormalidades na arquitetura genômica podem causar grande variedade de manifestações clínicas, incluindo deficiência intelectual, malformações congênitas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, déficit no crescimento, dismorfismos faciais, dentre outras (Vasconcelos et al., 2007; Vissers et al., 2010).

As alterações fenotípicas estão presentes em 8,1% das gestações reconhecidas clinicamente, representando umas das principais causas de mortalidade em estágios precoces do desenvolvimento fetal, e com uma frequência de aproximadamente 50% dos abortos espontâneos, 6% entre os natimortos e 0,8% nos nascidos vivos (Vasconcelos et al., 2007; Kulikowski et al., 2013), no entanto o diagnóstico inequívoco dessas anormalidades nem sempre é possível.

1.2. Métodos de detecção de alterações submicroscópicas

A análise microscópica dos cromossomos isolados de linfócitos do sangue periférico por bandamento G tem sido utilizada para identificar desequilíbrios genéticos ao longo dos últimos 55 anos, como as aneuploidias e os grandes rearranjos cromossômicos estruturais, incluindo translocações, deleções e

duplicações. Porém a técnica de cariotipagem não tem capacidade para detectar anormalidades menores que 5 Mb (Trask, 2002; Shaffer e Bejjani, 2006; Gijsbers et al., 2009; Hochstenbach et al., 2009) e um número considerável de fenótipos clínicos causados por rearranjos cromossômicos submicroscópicos permanece subdiagnosticado (Visser et al., 2010).

Dentre as anormalidades cromossômicas, estima-se que aproximadamente 70% dos portadores de malformações congênitas associadas à deficiência cognitiva tenham aneuploidias de cromossomos inteiros, como as trissomias do 13, 18 e 21, e/ou aneuploidias dos cromossomos sexuais. Outros 12% dos pacientes carregam deleções e duplicações parciais, terminais ou intersticiais. Pouco mais de 8% das alterações encontradas são microdeleções, como a síndrome Velocardiofacial/DiGeorge (del 22q11) e as síndromes de Angelman e Prader-Willi (del 15q11). Os 10% restantes são causados por translocações equilibradas, inversões, inserções ou mosaicismo (Rauch et al., 2006).

Os rearranjos submicroscópicos têm sido relatados em pacientes com o cariótipo clássico aparentemente normal e fenótipo clínico inexplicável (Rosenberg et al., 2006), sendo que as regiões subteloméricas estão frequentemente alteradas em pacientes com deficiência intelectual (Gijsbers et al., 2009).

Para superar as limitações do cariótipo tradicional e detectar as alterações submicroscópicas ou crípticas foram desenvolvidas técnicas de citogenética molecular (Shaffer e Bejjani, 2004), como a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization*) e a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA, do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Gijsbers et al., 2009; Hochstenbach et al., 2009).

Porém ambos os métodos investigam um número limitado e específico de regiões do genoma, diagnosticando principalmente as síndromes de microdeleções/microduplicações mais comuns e as alterações de regiões subteloméricas (Hochstenbach et al., 2009). Já a técnica de triagem genômica por *array* é bem mais abrangente, possibilitando a análise de milhares de alvos

genômicos ao mesmo tempo (Gijsbers et al., 2009).

1.2.1. Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de FISH surgiu na década de 80 a fim de suprir a limitação da citogenética clássica e deu início à citogenética molecular. Esta técnica consiste no emparelhamento de sondas *locus* específicas marcadas por fluorescência para suas sequências complementares no genoma (Pinkel et al., 1986; Trask, 2002; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Tsuchiya, 2011).

Atualmente, existem diversas sondas específicas disponíveis comercialmente, que permitem a avaliação destas regiões em cada metáfase e/ou intérfase analisada, sendo que o tamanho das sondas varia de 5 a 500 kb, conforme o tipo e a região avaliada (Salman et al., 2004; Emanuel e Saitta, 2007; Kriek et al., 2007; Tsuchiya, 2011).

Uma das sondas muito utilizada na FISH é a de sequências repetitivas, como as sondas centroméricas (DNA alfa satélite), que são empregadas para determinar o número de cópias de cada cromossomo, e as teloméricas, para a avaliação das extremidades dos cromossomos.

Existem também as sondas de *locus* único, que são utilizadas para identificar deleções e duplicações em regiões ou genes específicos (por exemplo, para a síndrome de Williams-Beuren ou DiGeorge).

Também foram desenvolvidas as sondas de pintura cromossômica (*chromosome painting*), que são diversas sondas que se ligam em um único cromossomo e dão a impressão de pintá-lo com um todo. Estas sondas são úteis para delinear translocações e identificar a origem de um cromossomo extranumerário.

Além destas, ainda temos as sondas para identificar as aneuploidias comuns (13, 18, 21, X e Y), as sondas de fusão gênicas, que investigam a fusão de dois genes decorrentes de uma translocação, dentre outras (Eastmond et al., 1995; Shaffer e Bejjani, 2004 e 2006; Kulikowski et al., 2013).

Dessa forma, com a técnica de FISH podemos caracterizar o genoma do paciente investigando deleções, duplicações, translocações (equilibradas e não equilibradas), alterações em mosaico (duas linhagens celulares diferentes), definir a origem de um cromossomo marcador, ou caracterizar um rearranjo complexo (Price et al., 1993; Ommen et al., 1995; Shaffer e Bejjani, 2006).

Uma vantagem da FISH é a possibilidade de ser realizada em diversos materiais, como sangue periférico, vilosidade coriônica, tecidos parafinados, dentre outros, não necessitando de cultivo celular já que podemos investigar os núcleos interfásicos (Price et al., 1993; Eastmond et al., 1995; Ommen et al., 1995; Tsuchiya, 2011).

Porém, a aplicação da investigação por este método requer uma suspeita clínica consistente com uma síndrome bem definida ou um cariótipo anormal indefinido que exija uma melhor caracterização molecular, pois, como já mencionado anteriormente, as sondas são específicas para regiões pesquisadas e não fornecem informações sobre o resto do genoma (Shaffer e Bejjani, 2006; Kriek et al., 2007; Tsuchiya, 2011).

Além disso, apenas uma ou poucas alterações (combinação de sondas) podem ser avaliadas simultaneamente, sendo, desta forma, uma técnica considerada demorada e dependente de um profissional altamente capacitado para a escolha das sondas, realização da técnica e análise dos resultados (Song et al., 1993; Kriek et al., 2007; Tsuchiya, 2011).

1.2.2. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A MLPA também é uma técnica utilizada para a detecção de deleções e/ou duplicações em doenças genéticas de interesse (Kozlowski et al., 2008; Cho et al., 2009), sendo considerada uma alternativa mais rápida e economicamente mais viável que outras técnicas moleculares (Shen e Wu, 2009; Pohovski et al., 2013).

Esse método, descrito primeiramente por Schouten e colaboradores em 2002, permite a triagem genômica quantitativa de sequências alvo específicas,

baseada na hibridação simultânea e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) de mais de 45 sondas diferentes em uma única reação (Schouten et al., 2002; Kozłowski et al., 2008; Shen e Wu, 2009; Jennings et al., 2011).

A triagem de alterações subteloméricas ou de microalterações específicas por MLPA revela uma taxa de 5 a 10% de anomalias em pacientes com cariótipo convencional normal (De Vries et al., 2003; Koolen et al., 2004; Kirchhoff et al., 2007). Desta forma, em um único teste, a MLPA é capaz de avaliar pacientes que apresentam características fenotípicas de síndromes de microdeleção/microduplicação, tais como Williams-Beuren, Smith-Magenis, dentre outras (Kirchhoff et al., 2007; Cho et al., 2009).

A técnica também pode ser utilizada para pacientes com suspeita clínica de alterações subteloméricas de uma maneira mais simples e rápida, já que permite a avaliação de todos os subtelômeros humanos em uma única reação (Fernández et al., 2005; Vorstman et al., 2006; Ahn et al., 2007).

Para cada alvo um par de sondas específicas é utilizado, sendo que cada uma delas contém uma sequência de complementariedade para a região de interesse (sequência de hibridação) e uma sequência de *primer* universal (Kozłowski et al., 2008; Villamón et al., 2008; Shen e Wu, 2009).

Além da sua vantagem *multiplex* para a análise de diversas regiões em uma única reação, esta técnica requer uma pequena quantidade de DNA (20-500 ng) para a detecção de deleções e duplicações em um único éxon, sendo altamente específica, já que para cada sequência duas sondas ligadas entre si são necessárias para que ocorra a amplificação dos fragmentos (Schouten et al., 2002; Kozłowski et al., 2008; Mandal et al., 2009).

Para a interpretação dos resultados produzidos por esta técnica são necessários controles normais extraídos a partir do mesmo tecido para cada reação, isto porque a MLPA é uma metodologia comparativa, assim a intensidade relativa de cada pico é comparada para que deleções e/ou duplicações possam ser identificadas (González et al., 2008; Mandal et al., 2009; Rooms et al., 2011).

A principal limitação da técnica de MLPA é que, diferente da FISH, não conseguimos visualizar a localização cromossômica da alteração, assim translocações não são detectadas (Jennings et al., 2011). Ainda devemos lembrar que apesar de conseguirmos avaliar diversas regiões genômicas, precisamos de uma suspeita clínica para direcionar a pesquisa para um *kit* específico.

1.2.3. Array (*Chromosomal Microarray Analysis* – CMA) ou triagem do genoma completo

Outra técnica de citogenética molecular muito utilizada recentemente para o estudo de microalterações no genoma é o *array*. Esta metodologia permite a quantificação de todo o genoma de um paciente com um alto nível de resolução (cerca de 0,7 kb) dependendo da plataforma, tipos de sondas e como elas são distribuídas no genoma (Manning e Hudgins, 2010; Vissers et al., 2010; Siggberg et al., 2012).

A técnica de *array* consiste na hibridação por complementariedade do DNA proveniente de diversas amostras biológicas às sondas (segmentos de sequência genômica) contidas nas lâminas ou *chips* de *arrays* e posterior análise da emissão de fluorescência das sequências pesquisadas por meio de *softwares* específicos (Salman et al., 2004; Emanuel e Saitta, 2007).

Atualmente existem diversas empresas que disponibilizam esta tecnologia em diferentes plataformas e lâminas/*chips*. Todas estas lâminas/*chips* apresentam uma alta densidade ou cobertura do genoma, mas variam entre si em relação à quantidade de sondas utilizadas, sendo que algumas delas podem interrogar cerca de milhões de regiões em uma única amostra (Emanuel e Saitta, 2007; Edelmann e Hirschhoern, 2009; Vissers et al., 2010; Alkan et al., 2011; Siggberg et al., 2012).

A principal vantagem do *array* é sua capacidade de investigar o genoma completo simultaneamente em um mesmo experimento, com um maior poder de resolução e acurácia em relação à citogenética tradicional e molecular, já que

ele permite a investigação de rearranjos muito sutis, mas que podem ter impacto no fenótipo de pacientes sem diagnóstico definido (Bruno et al., 2009; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Manning e Hudgins, 2010).

Assim, o *array* tem sido empregado no diagnóstico de pacientes com deficiência intelectual e/ou anomalias congênitas múltiplas e cariótipo em bandamento G prévio normal. Além da sua capacidade em detectar, em um único teste, ganhos e perdas submicroscópicas de todo o genoma, também podemos identificar mosaicismos (> 30%), aneuploidias, regiões de perda de heterozigosidade (LOH, do inglês, *Loss of Heterozygosity*) e dissomia uniparental (UPD, do inglês, *Uniparental Disomy*) (Slavotinek, 2008; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Gijsbers et al., 2009; Fan et al., 2013). E essas 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; Stankiewicz e Beaudet, 2007).

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

A principal limitação do *array* é a incapacidade em detectar translocações equilibradas ou inversões sem perdas de material genômico, assim como a posição cromossômica da alteração. Outra ressalva importante para esta técnica é o seu custo elevado, tempo do experimento (3 a 5 dias) e interpretação dos resultados, na qual apenas um profissional altamente capacitado consegue avaliar quais dos muitos dados gerados são realmente importantes para descrição e correlação clínica (Gijsbers et al., 2009; Bi et al., 2013; Vallespín et al., 2013).

1.3. Método mais indicado para o diagnóstico molecular

Alcançar um diagnóstico inequívoco é fundamental para entender a etiologia 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 *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 publicou portaria do Ministério da Saúde com as primeiras diretrizes políticas de genética clínica do Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo exames e aconselhamento genéticos na rede de saúde a partir de 2009. E este ano, uma nova portaria (nº 199 de 30 de janeiro de 2014) instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras e aprovou as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do SUS viabilizando incentivos financeiros de custeio.

Dessa forma, os serviços de genética, principalmente aqueles ligados às universidades estaduais e federais, devem se preparar para receber um número maior de exames e precisam estudar as melhores estratégias de investigação em cada caso.

Introduzir apenas um método diagnóstico molecular, como por exemplo o *array*, como primeira linha de investigação para os pacientes com anomalias congênitas em nosso país é inviável devido ao alto custo. Portanto, este projeto investigou o uso destas novas tecnologias (FISH, MLPA e *array*) necessárias na definição diagnóstica dos pacientes, comparando-as em relação à sua especificidade e sensibilidade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Comparar a capacidade diagnóstica das técnicas FISH, MLPA e *array* para identificação de microdeleções e microduplicações do DNA em pacientes com MC/ADNPM;
- Avaliar a viabilidade para implantação das técnicas citogenômicas (FISH, MLPA e *array*) para o diagnóstico de MC/ADNPM;
- Avaliar a dificuldade de interpretação do significado das CNVs encontradas.

———— ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

A amostra do presente trabalho foi obtida por meio de análise dos resultados citogenômicos de 78 pacientes que foram avaliados pelas técnicas de FISH, MLPA e/ou *array* em diferentes projetos anteriormente aprovados (CAPPesq 0371/10, 0282/11 e 0718/11) e realizados no Laboratório de Pediatria Clínica (LIM 36) e no Laboratório de Citogenômica (LIM 03), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Todos os genitores ou responsáveis autorizaram a realização da pesquisa, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de cada projeto específico.

Os pacientes passaram por uma anamnese detalhada, na qual foram abordados dados de história clínica evolutiva, desenvolvimento neuropsicomotor, antecedentes gineco-obstétricos maternos, histórico familiar, heredograma e exames complementares pré e pós-natais.

O critério de seleção dos pacientes para a análise dos resultados foi a presença de malformações congênitas associadas ao atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, com cariótipo por bandamento G prévio normal ou considerado insuficiente para a conclusão diagnóstica e clínica.

Foram considerados malformados os pacientes que apresentaram alterações morfológicas, estruturais, ou funcionais presentes ao nascimento, sendo ao menos uma malformação maior (como por exemplo cardiopatia congênita, agenesia de corpo caloso, malformação renal, dentre outras) ou mais de duas malformações menores consideradas dismorfias (como orelhas de baixa implantação, hipertelorismo ocular, hipertelorismo mamário, íris estrelada, coloboma de íris ou pupila, dentre outras) (Jones, 2006).

Além das malformações, os pacientes também foram classificados como

portadores de ADNPM.

O exame físico dos pacientes foi realizado por médicos geneticistas da Unidade de Genética Clínica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr/HC-FMUSP) e/ou pela médica geneticista do Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar (HMMAA), por meio da descrição detalhada do fenótipo e pela aferição antropométrica.

Quando necessário, o material genético dos pais também foi analisado para a correta classificação das alterações encontradas.

Este projeto teve aprovação do CAPPesq nº 0619/11 (Anexo A) e o apoio financeiro CNPq (Edital MCT/CNPq/CT – SAÚDE nº 57/2010 – Processo nº 401910/2010-5) e FAPESP (Edital PPSUS – Processo nº 2009-53105-09).

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta da amostra

Foram coletados cerca de 4 mL de sangue periférico dos pacientes em tubo contendo como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (tampa roxa) para a extração de DNA e realização da técnica de MLPA e *array* e em alguns casos mais 4 mL de sangue periférico em tubo contendo como anticoagulante a heparina (tampa verde) para a cultura de linfócitos e técnica de FISH. Quando necessário também foram coletadas amostras dos genitores.

3.2.2. Cultura de linfócitos de sangue periférico

As culturas de linfócitos foram realizadas segundo modificações da técnica de Moorhead et al. (1960).

Protocolo para a cultura de linfócitos:

Aproximadamente 0,5 mL de sangue total de cada amostra foi semeado em tubo estéril de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura PB-MAX™ *Karyotyping Medium* (Gibco®).

As culturas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por aproximadamente 72 horas. Após, 65 µL de colchicina *KaryoMAX® COLCEMID® Solution* (Gibco®) na concentração final de aproximadamente 0,12 µg/mL foram adicionadas às culturas e essas incubadas por 1 hora na estufa a 37°C. Após esse período, o material cultivado foi submetido à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado com a adição de 8 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M). Os frascos de cultura foram novamente incubados em estufa a 37°C por 15 minutos e em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução fixadora gelada (~ -20°C) constituída por metanol (*Merck*) e ácido acético glacial (*Merck*), na proporção de 3:1, para que o processo de hipotonização fosse interrompido. A cultura com a solução fixadora foi homogeneizada e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado. Ao sedimento, foram adicionados 6 mL de solução fixadora gelada.

Esse processo de fixação foi repetido por mais três vezes, sempre homogeneizando, centrifugando, descartando o sobrenadante e adicionando a solução fixadora gelada nos volumes de 6 mL, 6 mL e 2 mL em cada passo respectivamente. Com material final obtido (células em solução fixadora) foram preparadas lâminas para a realização da técnica de FISH.

As lâminas foram previamente lavadas com sabão tipo *Extran®* (*Merck*) (detergente não residual) e colocadas levemente inclinadas em um suporte no banho maria a 90°C. O material proveniente da cultura celular, devidamente fixado, foi ressuspensionado em um volume de 200 µL e pingado aos poucos na lâmina a uma distância de aproximadamente 90 cm. Após as lâminas estarem secas, estas foram observadas ao microscópio em contraste de fase para

verificar a qualidade das culturas e crescimento celular.

As lâminas foram então destinadas à técnica de FISH e o restante do material foi armazenado em *freezer* a -20°C.

3.2.3. Isolamento e quantificação de DNA

O material genético dos indivíduos estudados foi extraído por meio do *kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) (Qiagen)* segundo protocolo do fabricante com algumas modificações, incluindo a redução do volume de eluição para 100 µL. Essa modificação permitiu uma concentração maior de DNA genômico ideal para armazenamento e realização das técnicas citogenômicas.

Protocolo para a extração de DNA:

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado foram misturados 20 µL de Protease com 200 µL de sangue periférico total. Após a homogeneização, foram adicionados 200 µL do *Buffer AL* e a mistura foi levada ao *vortex* por 15 segundos.

O tubo foi incubado a 56°C durante 10 minutos e centrifugado brevemente, após foram adicionados 200 µL de etanol absoluto e novamente homogeneizado no *vortex* e centrifugado.

A mistura foi aplicada na coluna de extração e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. Terminada a centrifugação, o tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL.

Foram adicionados 500 µL do *Buffer AW2* e centrifugados a 14000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi, então, transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 100 µL de *Buffer AE*. O tubo foi incubado durante 5 minutos, centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto e a coluna foi descartada.

A concentração e qualidade das amostras de DNA foram determinadas por

meio do gel de eletroforese a 1,5% e espectrofotômetro *NanoVue®* (GE Healthcare Life Sciences) e as alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.2.4. Técnicas avaliadas

3.2.4.1. Técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A FISH é uma técnica que permite a avaliação de sequências específicas de DNA em cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos após o cultivo de linfócitos de sangue periférico.

Neste método, sondas de DNA marcadas com fluorescência são hibridadas para detectar a presença, número e localização de pequenas (submicroscópicas) regiões dos cromossomos. Ela é usada para identificar e caracterizar anormalidades cromossômicas ou confirmar a suspeita clínica de síndromes de microdeleção/microduplicação conhecidas (Vermeesch et al., 2007).

A técnica de FISH consiste na denaturação do DNA da sonda e do DNA cromossômico por meio da elevação da temperatura associada ou não a substâncias alcalinas. A partir de uma temperatura adequada (~ 37°C), caso haja complementariedade entre as sequências, ocorrerá a hibridação entre a sonda e o DNA alvo. A sequência marcada fluorescentemente pode ser observada sob microscopia de fluorescência com filtros adequados para o fluorocromo utilizado (Pardue e Gall, 1969; Maluf e Riegel, 2011).

Neste estudo foram utilizadas sondas comerciais de sequências únicas (tamanho aproximado de 100 – 200 kb), disponíveis para as síndromes mais frequentes, de acordo com a suspeita clínica – *Aquarius® Microdeletion Syndrome probes* (Cytocell). A pesquisa de microalterações subteloméricas foi necessária em alguns casos e foram utilizadas sondas comerciais específicas – *Aquarius® Subtelomere Specific probes* (Cytocell) (Quadro 2, Anexo B). A

técnica, descrita por Pinkel e colaboradores em 1986, foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante com algumas modificações.

Quadro 2 – Tipos de sondas da FISH utilizadas neste estudo

Sonda	Região cromossômica/ cor da sonda	Tipo de sonda
<i>DiGeorge/VCFs TUPLE1 and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe Combination – LPU 004®</i>	22q11.2 (vermelha) 22q13.3 (verde)	Síndromes de microdeleção
<i>Saethre-Chotzen and Williams-Beuren Combination – LPU 024®</i>	7p21.1 (vermelha) 7q11.23 (verde)	
<i>Wolf-Hirschhorn – LPU 009®</i>	4p16.3 (vermelha) 4qter (verde)	
<i>Cri-Du-Chat and SOTOS Probe Combination – LPU 013®</i>	5p15 (verde/vermelha) 5q35 (verde)	
<i>Smith Magenis (FLII) and Miller-Dieker Probe Combination – LPU 007®</i>	17p13.3 (vermelha) 17p11.2 (verde)	
<i>Subtelomere Specific Probe – LPT 09P</i>	9pter (verde) (distância do telômero – 600 kb)	Subtelomérica

Protocolo da técnica de FISH:

A lâmina de microscopia, previamente preparada e contendo o material do paciente, foi tratada com 2 x SSC, pH 7,0, por 2 minutos a temperatura ambiente e então foi desidratada em banhos seriados de etanol (*Merck*) 70%, 85% e 100%, durante 2 minutos cada e seca a temperatura ambiente.

Em seguida, 5 µL da sonda específica foram espalhadas sobre a lâmina e esta recoberta com uma lamínula de vidro. Após, a lâmina foi colocada sobre uma placa quente a 75°C (+/- 1°C) e o material denaturado por 3 minutos.

Decorrido a denaturação do material genético do paciente e das sondas de FISH, a lâmina com a lamínula foi embrulhada e vedada com filme plástico de parafina (*Parafilm M.®*) e guardada em câmara úmida ao abrigo da luz por aproximadamente 18 horas a 37°C (+/- 1°C) para que ocorresse a hibridação das sondas nas sequências específicas do DNA.

No dia seguinte, o filme plástico de parafina (*Parafilm M.®*) e a lamínula

foram removidos e a lâmina lavada em solução de 0,4 x SSC, pH 7,0, por 2 minutos a 72°C (+/- 1°C) e, em seguida, em solução 2 x SSC/0,05% Tween®-20 (*Sigma-Aldrich*®) por 30 segundos a temperatura ambiente.

A lâmina foi deixada inclinada até que estivesse seca e após foram aplicados 10 µL do contracolorante DAPI *antifade* (4,6-diamidino-2-fenilindol) e então a lâmina foi recoberta com lamínula de vidro e observadas ao microscópio de epifluorescência após, pelo menos, 10 minutos de incubação.

Análise das lâminas de FISH:

As lâminas submetidas à técnica de FISH foram analisadas no microscópio de epifluorescência Axio Imager.A2® (*Carl Zeiss AG*) com os filtros para DAPI, FITC e Rhod para detectar a presença ou ausência dos sinais correspondentes às regiões alvo-específicas. Foram analisadas 20 células em metáfase e interfase, e a documentação foi realizada por meio da captura das células pelo sistema de imagem Isis v5.4.7 (*MetaSystems GmbH*).

3.2.4.2. Técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)

A técnica de amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação visa a quantificação relativa do número de cópias de aproximadamente 45 sequências do genoma em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em diversos genes ou regiões cromossômicas (Schouten et al., 2002; Ahn et al., 2007).

Uma característica peculiar da técnica de MLPA é que ocorre a amplificação das sondas que se ligaram ao DNA e não a amplificação das sequências genômicas. As sondas são compostas por duas partes, a primeira considerada curta e composta por oligonucleotídeos sintéticos e a outra derivada de um bacteriófago M13, e considerada longa. Cada sonda curta apresenta uma

sequência alvo específica de 21-30 nt na extremidade 3' e, na extremidade 5', uma sequência comum de 19 nt idêntica ao *primer* marcado. As sondas longas apresentam um tamanho de 80-420 nt e são compostas por uma sequência alvo específica de 25-43 nt no final 5', uma sequência de 36 nt complementar a um *primer* não marcado comum para todas as sondas longas, e uma sequência *Stuffer* de tamanho variado (19-370 nt) entre as duas sequências anteriores (Figura 2) (Schouten et al., 2002; Sellner e Taylor, 2004; Sørensen et al., 2008).

Figura 2 – Modelo de constituição da sonda da MLPA. Em azul estão as sequências específicas para hibridação, em preto os *primers* universais e em verde a sequência intercalar de tamanho diferente de acordo com a sonda (sequência *Stuffer*). Note que a sequência intercalar e os *primers* não se ligam ao DNA (modificado de www.mlpa.com)

Estas sondas hibridam em locais adjacentes na sequência alvo do DNA e são unidas entre si por uma ligase, formando uma molécula única que será amplificada exponencialmente durante a reação de PCR. Como cada metade das sondas possuem uma sequência de um *primer* universal em sua extremidade (posições 3' e 5'), ou seja um único par de *primers* marcados fluorescentemente para todas as sondas do *kit*, a reação de amplificação das sondas ocorre simultaneamente e a quantidade relativa de sondas ligadas (extremidade curta e extremidade longa) no início da reação de PCR corresponde à quantidade (número de cópias) das sequências alvo na amostra (Schouten et al., 2002; Sellner e Taylor, 2004; Lam et al., 2006; Vorstman et al., 2006).

Para distinguir as diferentes sondas utilizadas em um mesmo experimento, cada uma delas possui um tamanho distinto de pares de bases que a identifica.

Essa diferença é dada pela presença de uma sequência intercalada entre um dos *primers* e a sequência de hibridação, a sequência *Stuffer*. Assim, cada produto amplificado possui um tamanho único que varia de 130 a 480 bp entre as sondas de um mesmo *kit* (Schouten et al., 2002).

Os diferentes *amplicons* (sondas de MLPA + fragmentos de controle de qualidade gerados pela PCR) gerados são separados por eletroforese capilar e quantificados por meio de *softwares* específicos (Lam et al., 2006).

As reações de MLPA foram realizadas segundo orientações do fabricante, porém com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes. O protocolo comercial de cada *kit* da MLPA permite a realização de 100 reações, porém a partir de um protocolo desenvolvido e já bem padronizado pela Dra. Roberta Lelis Dutra, no Laboratório de Citogenômica (HC-FMUSP), o mesmo *kit* pôde ser utilizado para aproximadamente 300 reações, aumentando assim o custo-benefício da técnica (Dutra et al., 2014).

Para a investigação do DNA de cada paciente foram utilizados diversos *kits* disponíveis comercialmente: o SALSA MLPA *probemix* P064-B2 e B3 *Mental Retardation-1*[®] (Quadro 3, Anexo C), que investiga as principais síndromes de microdeleção/microduplicação, e o SALSA MLPA *probemix* P036-E1 *Human Telomere-3*[®] (Anexo D) e o SALSA MLPA *probemix* P070-B2 *Human Telomere-5*[®] (Anexo E), que investigam todos os subtelômeros humanos, com uma sonda no braço curto de cada cromossomo e uma no braço longo, com exceção dos cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22), que apresentam as duas sondas no braço longo, uma logo abaixo do centrômero e outra no subtelômero.

Quando disponível, também utilizamos alguns *kits* específicos para a confirmação das alterações encontradas: o SALSA MLPA *probemix* P250-B1 *DiGeorge*[®] (Anexo F) e o SALSA MLPA *probemix* P356-A1 *Chromosome 22q*[®] (Anexo G) específicos para o cromossomo 22, e o SALSA MLPA *probemix* P029-A1 *Williams-Beuren Syndrome*[®] (Anexo H), específico para alterações no cromossomo 7q11 (MRC-Holland, www.mlpa.com).

As sondas presentes em cada *kit* de MLPA, bem como a localização genômica, a região cromossômica e o tamanho de cada sonda estão detalhadas

nos anexos.

Quadro 3 – Regiões pesquisadas na MLPA pelo *kit* P064 para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação

SALSA MLPA <i>probemix</i> P064		
Síndrome	Região do cromossomo	Nº sondas
Deleção 1p36	1p36	7
Williams-Beuren	7q11.23	6
Smith-Magenis	17p11.2	5
Miller-Dieker	17p13.3	7
Deleção 22q11.2	22q11.21	6
Prader-Willi/Angelman	15q11.2	5
Alagille	20p12.2, gene <i>JAG1</i>	2
Saethre-Chotzen	7p21, gene <i>TWIST1</i> e <i>TWISTNB</i>	2
Sotos	5q35.3, gene <i>NSD1</i>	3

NOTA: Na primeira coluna estão descritas as síndromes pesquisadas neste *kit* de MLPA, na segunda coluna estão as regiões cromossômicas correspondentes a cada síndrome pesquisada e na terceira a quantidade de sondas em cada região.

Protocolo da técnica de MLPA:

A reação de MLPA foi realizada em quatro etapas principais: 1) Denaturação do DNA e hibridação deste com as sondas de MLPA; 2) Reação de ligação entre as duas partes das sondas; 3) Reação de PCR; 4) Separação por eletroforese capilar dos produtos amplificados e posterior análise dos dados (Figura 3).

Figura 3 – Etapas do método de MLPA. Denaturação do DNA e hibridação das sondas às regiões de complementariedade do genoma; Ligação entre as partes das sondas por meio de uma enzima ligase; PCR para amplificação das sondas ligadas; Análise dos fragmentos amplificados, em que cada pico corresponde a uma sonda (modificado de www.mlpa.com)

Para a primeira fase, na qual ocorre a denaturação do DNA e a hibridação das sondas às regiões de complementariedade ao DNA, foram pipetados 1 μL de DNA genômico na concentração de aproximadamente 80 ng/ μL em microtubos de 0,2 mL. Os tubos foram colocados no termociclador *Mastercycler® Nexus Gradient* (Eppendorf) para denaturação do DNA por 15 minutos a 98°C, com posterior resfriamento a 25°C. Durante esse tempo foi preparada uma

mistura contendo, para cada amostra ou tubo, 0,44 μL de tampão (SALSA MLPA *Buffer*), 0,44 μL de *probemix* (específico para cada *kit*) e 2,9 μL de *Nuclease-Free Water* (Qiagen). Com o termociclador a 25°C foram adicionados 1 μL da mistura por tubo e incubado por 1 minuto a 95°C e por 3 horas a 60°C.

Após o processo de hibridação das sondas de MLPA ao DNA, foi iniciada a segunda etapa da reação, ou seja, a ligação entre as duas metades das sondas. Para esta fase, foi preparada uma mistura contendo 0,8 μL de Ligase *Buffer A*, 0,8 μL de Ligase *Buffer B*, 7,3 μL de *Nuclease-Free Water* (Qiagen) e 0,29 μL de SALSA Ligase-65 por tubo. A quantidade de 8 μL da mistura foi adicionada em cada amostra no termociclador à temperatura de 54°C e homogeneizada com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 54°C, seguindo de 5 minutos a 98°C e mantidas a 20°C.

Na terceira etapa, em temperatura ambiente devido à *Taq* Polimerase ser termoestável, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados para que ocorresse a amplificação somente dos fragmentos unidos pela ligase. Dessa forma, foi preparada uma mistura contendo 0,7 μL de SALSA PCR *Primer Mix*, 4,86 μL de *Nuclease-Free Water* (Qiagen) e 0,29 μL de SALSA *Polymerase* e distribuídos 5 μL desta mistura em cada tubo correspondente a cada amostra. Os tubos foram colocados no termociclador e selecionado o programa da PCR: 35 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por mais 30 segundos e 72°C por 1 minutos, com posterior extensão a 72°C por 20 minutos e mantidos a 15°C. Os produtos amplificados foram mantidos no *freezer* a -20°C até o momento da preparação das placas para a separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

Quadro 4 – Componentes do *kit* de MLPA

Componentes dos <i>kits</i>	
Reagentes	Componentes
SALSA MLPA <i>Buffer</i> (tampa amarela)	KCl, Tris-HCl, EDTA e PEG_6000. pH 8,5
<i>Probemix</i> (tampa preta)	Oligonucleotídeos sintéticos, oligonucleotídeos purificados de bactérias, Tris-HCl, EDTA. pH 8,0
SALSA Ligase-65 (tampa verde)	Glycerol, BRIJ (0,05%), EDTA, Beta-Mercaptoethanol (0,1%), KCl, Tris-HCl. pH 7,5, enzima Ligase-65 (origem bacteriana)
Ligase <i>Buffer</i> A (tampa transparente)	NAD (origem bacteriana). pH 3,5
Ligase <i>Buffer</i> B (tampa branca)	Tris-HCl, detergentes não-iônicos, MgCl ₂ . pH 8,5
SALSA PCR <i>Primer Mix</i> (tampa marrom)	Oligonucleotídeos sintéticos, um deles é marcado fluorescentemente (FAM, Cy5,0 ou outro dye, dependendo do instrumento de eletroforese capilar utilizado), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0,04%). pH 8,0
SALSA <i>Polymerase</i> (tampa laranja)	Glycerol, BRIJ (0,5%), EDTA, DTT (0,1%), KCl, Tris-HCl, enzima <i>Polymerase</i> (origem bacteriana). pH 7,5

NOTA: Na primeira coluna estão descritos todos os reagentes presentes nos *kits* de MLPA e na segunda todos os componentes.

No Quadro 5 segue a descrição do programa para as reações de MLPA no termociclador.

Quadro 5 – Temperatura e tempo utilizados no termociclador para a reação de MLPA

Denaturação do DNA		
	98°C	15 minutos
	25°C	∞
Reação de Hibridação		
	95°C	1 minuto
	60°C	3 horas
Reação de Ligação		
	54°C	pausa
	54°C	15 minutos
	98°C	5 minutos
	20°C	∞
Reação de PCR		
35 ciclos	98°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	1 minuto
	72°C	20 minutos
	15°C	∞

Para a preparação das placas, 1 µL dos produtos amplificados de cada amostra foram diluídos em 9 µL de *Nuclease-Free Water* (Qiagen). A partir desta diluição, 1 µL foi adicionado em cada poço correspondente da microplaca *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems®) juntamente com 9,0 µL de HiDi™ Formamide (Applied Biosystems®) e 0,075 µL de *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0* (Applied Biosystems®) e a mistura foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta.

Antes de realizar a leitura dos fragmentos no sequenciador, os produtos amplificados foram denaturados a 98°C por 5 minutos e em seguida postos no gelo para manter as fitas separadas.

A leitura das amostras foi feita por meio do sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* contendo 8 capilares (Applied Biosystems®) e de acordo com os parâmetros específicos para as reações de MLPA (Quadro 6).

Quadro 6 – Parâmetros de corrida necessários para a análise de fragmento no equipamento de eletroforese capilar ABI 3500

Parâmetros – ABI 3500	
Temperatura do equipamento	60°C
Tempo de corrida	2700 segundos
Voltagem da corrida	15 kV
Tempo de pré-corrida	180 segundos
Voltagem da pré-corrida	15 kV
Tempo de injeção	15 segundos
Voltagem de injeção	1,6 kV

Os dados com extensão .fsa foram gerados por meio dos sequenciadores automáticos da Rede de Equipamento Multiusuário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (nos laboratórios de Imunologia – LIM 19 / InCor e Genômica Pediátrica – LIM 36 / FMUSP).

Análise dos dados de MLPA:

A MLPA é uma técnica semi-quantitativa e permite a detecção de alterações no número de cópias de uma determinada região genômica de uma amostra de DNA em relação a amostras controles. Dessa forma, por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em todas as reações da MLPA foram utilizadas pelo menos três amostras controles previamente testadas e consideradas normais (indivíduo saudável), tanto em relação ao fenótipo como em relação ao genótipo (a análise do genoma completo das amostras controles não apresentou deleções e/ou duplicações). No caso dos *kits* subteloméricos, as amostras consideradas controle foram as próprias amostras testadas, já que pesquisamos 46 regiões subteloméricas diferentes (uma região subtelomérica do braço curto e uma do braço longo de cada cromossomo autossômico, totalizando 44 regiões diferentes, e mais duas regiões subteloméricas, correspondentes às regiões pseudo-autossômicas do braço curto e longo dos cromossomos sexuais, X e Y), assim uma amostra pode ser controle da outra, ou seja, uma amostra foi normalizada em relação à média de todas as outras amostras, já que é mínima a chance várias amostras terem a mesma alteração.

Para todos os *kits* da MLPA também temos os controles internos da reação, que são alguns fragmentos controles com tamanho variando entre 64 a 118 nt. Estes fragmentos são muito importantes para o controle de qualidade da reação e indicam se as amostras apresentaram quantidade insuficiente de DNA (*Q-fragments* – 64, 70, 76 e 82 nt), se a denaturação foi incompleta (*D-fragments* – 88 e 96 nt), ou sondas para determinar os cromossomos sexuais (*chromosome X and Y – specific fragments at 100-105-118 nt*).

Além dos controles, também foi utilizado um branco (tubo contendo H₂O ultra-pura ao invés da amostra de DNA) em cada reação feita, assim foi possível verificar a presença de contaminantes na água, reagentes da MLPA, ou reagentes da eletroforese e capilares. No branco, apenas os *Q-fragments* devem ter o sinal da sonda, pois os quatro fragmentos referentes não requerem a reação de ligação ou a presença de um DNA para serem amplificados, e eles já apresentam ambas as sequências dos *primers* na sua molécula.

Neste trabalho, os dados gerados pelo sequenciador, com extensão .fsa, foram analisados utilizando o *software* GeneMarker® v2.2.0 (Softgenetics – www.softgenetics.com) e os painéis pré-definidos com a identificação e o perfil da posição esperada de cada fragmento referente ao *kit* utilizado foram disponibilizados pela MRC-Holland (www.mlpa.com) (Figura 4).

Figura 4 – Página do *software* de análise GeneMarker® e modelo de seleção de dados para início da análise dos resultados (www.softgenetics.com)

Para a análise dos dados, foi realizada algumas normalizações comparativas nas amostras avaliadas em uma mesma corrida: A primeira normalização foi a intra-amostra (normalização por sondas controles internos), na qual foi feita a comparação dos picos correspondentes às sondas de interesse com os picos gerados pelas sondas de referência. As sondas de referência detectam sequências que são esperadas ter número normal de cópias em todas as amostras testadas. E a segunda normalização ocorreu inter-amostras (normalização de população), no qual o padrão de pico da amostra de interesse foi comparado à média do padrão de pico das amostras controle normal incluídas no mesmo experimento. Assim, é possível detectar sinais alterados que indicam deleção ou duplicação das sequências de interesse (www.mlpa.com).

Como diferenças no número de cópias das amostras podem ser detectadas por meio da comparação do padrão de picos (amostra e controle normal), visualizados por meio de *softwares* específicos, a análise foi feita considerando a altura do pico de cada produto amplificado, sendo que este reflete o número de cópias relativo de cada sequência-alvo. 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 cópias genômicas para o grupo de sondas utilizado no *kit* específico. Assim, na página da análise do programa, as alterações (deleções e/ou duplicações) puderam ser detectadas por quatro formas diferentes:

- **Sobreposição dos picos:** no eletroferograma é possível analisar a diminuição ou o aumento do tamanho dos picos de cada amostra. Os picos referentes à média dos controles utilizados aparecem em vermelho atrás dos picos referente à amostra, que aparecem em azul.

- **Histograma de dosagem:** exibe, na forma de barras, a relação das intensidades dos picos normalizados entre a referência e a amostra. Sondas da amostra são representadas pelas barras azuis e as sondas controles pelas barras pretas.

- **Tabela de relatório dos picos:** lista em colunas as informações sobre nome ou região de interesse (de acordo com o painel/*kit* selecionado) e o número de cópias de cada sonda.

- **Razão de plotagem:** gráfico representativo da relação da intensidade do pico normalizado entre a amostra e os controles. Cada ponto representa um pico da amostra ou a sonda específica, sendo que os pontos que estão entre as linhas verdes (limites de normalidade) referem-se ao número normal de cópias, acima deste limite estão os pontos correspondentes às regiões/sondas duplicadas e a baixo às deletadas.

Todas essas informações são interligadas e correspondentes, assim, por exemplo, ao indicar em um pico no histograma o mesmo é iluminado nas outras formas de análise (Figura 5).

Figura 5 – Relatório de análise da MLPA gerado pelo *software* GeneMarker®. A imagem (A) refere-se à análise da sobreposição dos picos e histograma de dosagem, no qual o pico azul corresponde à amostra e o vermelho ao controle; a imagem (B) refere-se à tabela com as descrições das sondas e número de cópias; e a (C) a razão de plotagem, na qual cada ponto corresponde a uma sonda e as linhas os limites de duas cópias

Como resultado final foi considerado com número de cópias dissômico (normal) um sinal normalizado com valor igual a 1 e no caso de deleções ou duplicações, um sinal de normalização menor que 0,75 ou maior que 1,25, respectivamente (Bunyan et al., 2004; Vorstman et al., 2006; Sørensen et al., 2008; Shen e Wu, 2009).

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 (www.mlpa.com).

Para que os efeitos negativos da técnica de MLPA fossem minimizados, foram comparadas apenas amostras que eram derivadas do mesmo tipo de tecido e obtidas por meio do mesmo método de extração, que apresentaram a qualidade do DNA dentro dos padrões pré-estabelecidos e com concentrações

semelhantes, e que foram submetidas às condições similares de tratamento e armazenamento. As reações com um resultado duvidoso em relação à qualidade da corrida foram repetidas para confirmação dos resultados.

3.2.4.3. Técnica de *array*

A tecnologia do *array* é uma poderosa ferramenta molecular, que realiza um escaneamento completo do genoma, podendo detectar e avaliar alterações (deleções e/ou duplicações submicroscópicas), mapear a localização genômica dos pontos de quebra destas alterações, caracterizar mecanismos de formação dos rearranjos e, assim, determinar a patogenicidade de doenças (Vallespín et al., 2013). Além disso, também é possível identificar mosaicismos e regiões com LOH, que podem levar à identificação de UPD e consanguinidade parental, associadas com um aumento do risco de malformações congênitas e doenças autossômicas recessivas (Manning e Hudgins, 2010; Bi et al., 2013; Fan et al., 2013).

Esta metodologia já é considerada o padrão ouro para avaliação do genoma em pacientes com malformações congênitas, deficiência intelectual e distúrbios neurológicos incluindo depressão, esquizofrenia e autismo (Mefford et al., 2009; Vallespín et al., 2013; Connolly et al., 2014).

A resolução da avaliação do genoma por meio da técnica de *array* (cariotipagem molecular) vai depender a escolha entre as diversas plataformas e densidade de lâminas/*chips* diferentes disponíveis comercialmente, ou seja, do tipo e da quantidade de sondas utilizadas e como elas são distribuídas no genoma (Vermeesch et al., 2007; Manning e Hudgins, 2010; Vallespín et al., 2013), sendo que esta técnica aumenta em 8-17% o diagnóstico de pacientes com alterações no desenvolvimento e anomalias congênitas sem etiologia conhecida (Edelmann e Hirschhorn, 2009; Bi et al., 2013).

Para este trabalho foram utilizadas três plataformas diferentes: *Agilent Technologies*, *Affymetrix* e *Illumina*, que diferem entre si na tecnologia empregada. Em todos os casos a amplificação do DNA, hibridação, marcação e

lavagens foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. A seguir estão descritas as características das plataformas e lâminas/*chips* utilizados neste estudo:

Array-CGH (array por hibridação genômica comparativa):

As plataformas de *array*-CGH (CGH, do inglês, *Comparative Genomic Hybridization*) são baseadas no princípio da hibridação comparativa entre duas amostras (amostra teste e controle) marcadas com um fluorocromo e um conjunto de alvos de hibridação (oligonucleotídeos). A razão dos sinais entre a amostra teste e o controle é normalizado e considerado como um perfil de número de cópias. Desta forma, para esta análise, é muito importante ter um controle normal que apresenta a mesma quantidade de DNA e fluorescência que a amostra teste, evitando assim resultados falso-positivos ou negativos (Vermeesch et al., 2007; Alkan et al., 2011).

- **Agilent:**

No *array*-CGH da plataforma *Agilent* as sondas são adicionadas base por base em uma lâmina de vidro específica. Cada sonda é formada por oligonucleotídeos de 60-mer e nesta plataforma foram utilizadas as lâminas *Human Genome CGH Microarray 2x105K[®]* ou *SurePrint G3 Human CGH Microarray 4x180K[®]*.

A lâmina de 105K possui aproximadamente 105.750 sondas, com um espaçamento médio de sondas de 22 kb, e a de 180K um total de 180.880 sondas, com um espaçamento médio de 13 kb.

Protocolo da técnica de *array* – Agilent:

A técnica de CGH-*array* da plataforma *Agilent* foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados no Laboratório de

Genômica Pediátrica – LIM 36 da FMUSP e no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Portugal.

As reações de CGH-*array* foram iniciadas a partir de 0,5-1,5 µg de DNA em volume final de 20,2 µL, tanto para as amostras dos pacientes (amostras teste) quanto para o DNA de referência da *Agilent* (amostra de DNA controle masculino disponível comercialmente).

No tubo do DNA teste e do controle foram adicionados 5,8 µL do *mix* de digestão e os tubos foram incubados a 37°C por 2 horas, 65°C por 20 minutos para a inativação de enzimas e mantidas a 4°C.

Após, em cada tubo foram adicionados 5 µL de *Random Primers* e foi iniciada a etapa de denaturação e fragmentação. Os tubos foram incubados por 3 minutos a 95°C e mantidos a 4°C.

Em seguida, foi adicionado na amostra teste e no controle 19 µL do *mix* das respectivas marcações fluorescentes, sendo esta a *Cyanine 3-Dutp* (verde) e *Cyanine 5-Dutp* (vermelha) e os tubos foram incubados em um termociclador a 37°C por 2 horas, 65°C por 10 minutos e mantidas a 4°C.

Na próxima etapa, todo o DNA marcado foi adicionado na coluna de purificação *Amicon*® 30 kDa (*Millipore*) e os tubos foram centrifugados. O material retido na coluna é o DNA marcado e foi quantificado para que fosse pareado a mesma quantidade de amostra teste e controle, evitando assim resultados falso-positivos ou negativos.

As amostras de DNA marcados foram combinadas com DNA humano *Cot-1* (*Kreatech Diagnostics*), tratadas com um agente bloqueador e tampão 2 x Hi-RPM *Agilent*®, e incubadas a 95°C por 3 minutos e 37°C por 30 minutos.

Após, as amostras foram hibridizadas nas lâminas e coladas no forno de hibridação a 65°C durante 40 horas em uma rotação constante de 20 rpm. Em seguida, a lâmina foi lavada com uma série de soluções específicas para remover os resíduos do que não foram hibridados.

A leitura das lâminas foi realizada pelo equipamento *SureScan Microarray Scanner*® e os dados da intensidade dos sinais foram extraídos e analisados pelo software *Feature Extraction v9.5*®.

SNP-Array:

Nas plataformas de SNP-arrays (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*), as sondas são desenhadas para identificar diferença de um único nucleotídeo nas sequências de DNA, ou pelo método de hibridação diferencial (*Affymetrix*) ou pelo método de extensão de uma única base (*Illumina*), portanto esta tecnologia permite uma acurácia maior do ponto de quebra das alterações, além de identificar baixo nível de mosaicismos (Alkan et al., 2011).

Outra vantagem do SNP-array é o uso das sondas de SNP alelo específicas, que aumentam a sensibilidade, distinguindo os alelos e identificando regiões de LOH e UPD por meio de um cálculo métrico denominado frequência do alelo B (BAF, do inglês, *B Allele Frequency*) (Stankiewicz e Beaudet, 2007; Winchester et al., 2009; Alkan et al., 2011).

Nos SNP-arrays, as alterações estão relacionadas às intensidades dos conjuntos de várias sondas iguais com intensidades normalizadas e a análise é feita comparando a intensidade de sinal da amostra teste em relação a um grupo de amostras analisadas ou a um banco de referências (Winchester et al., 2009; Alkan et al., 2011).

- ***Affymetrix:***

Neste array, as sondas são formadas de curtas sequências de oligonucleotídeos de 25-mer, sendo adicionadas no *chip* de quartzo base por base por meio de um processo que emprega uma combinação química e fotolitográfica.

Nesta plataforma foram utilizados o *chip CytoScan HD®*, que possui cerca de 2.696.550 de sondas de CNVs e 749.157 de SNPs, com uma cobertura média de sonda de 1,1 kb; e o *Genome-Wide Human SNP Array 6.0®*, com mais de 1,8 milhões de sondas, incluindo 906.600 sondas de SNPs e cerca de 946.000 sondas para a detecção de CNVs e um espaçamento médio de sondas de 1-5 kb.

Protocolo da técnica de *array* – *Affymetrix*:

A técnica de SNP-*array* da plataforma *Affymetrix* foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram processadas em um estudo colaborativo da *Affymetrix* com a FMUSP e a UNIFESP: “*Univesity of São Paulo Proof of Principle Study*”.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas duas alíquotas (uma para a etapa *Sty* e a outra para a etapa *Nsp*) de 5 µL de DNA de cada amostra a uma concentração final de 50 ng/µL.

Primeiramente foi realizada a etapa *Sty* e foram adicionados 14,75 µL da enzima de restrição *Sty* I (*Sty* I *Digestion Master Mix*) ao DNA genômico para que este pudesse ser digerido e as amostras foram incubadas a 37°C durante 2 horas, 65°C durante 20 minutos e mantidas a 4°C. Após, foram adicionados 5,25 µL do *Sty* I *Ligation Master Mix* para que ocorresse a etapa de ligação de um adaptador e as amostras foram incubadas a 16°C durante 3 horas, 70°C por 20 minutos e mantidas a 4°C. Terminada a incubação, em cada tubo foram adicionados 75 µL de água ultra-pura.

Após, as amostras foram divididas em três placas de PCR (colocar 10 µL em cada placa) e foi adicionado 90 µL do *Sty* PCR *Master Mix* em cada uma delas, e as amostras foram colocadas no termociclador no programa de 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos a 94°C, 60°C e 68°C por 30, 45 e 15 segundos, 1 ciclo de 68°C por 7 minutos e mantidas no gelo.

No segundo dia de experimento foram repetidos todos os passos anteriores para a etapa *Nsp*, utilizando o *Nsp* I *Digestion Master Mix*, o *Nsp* I *Ligation Master Mix* e o *Nsp* PCR *Master Mix*, com a diferença que para a etapa de PCR, as amostras foram divididas em quatro placas.

Após, os produtos amplificados (*Sty* e *Nsp* juntos) foram purificados pelo método de *beads* magnéticas (*AMPure XP beads*) ou precipitação por isopropanol e os produtos de PCR foram quantificados e diluídos.

Em todas as amostras foram adicionados os reagentes de fragmentação e

estas foram incubadas a 37°C por 35 minutos, 95°C por 15 minutos e mantidas a 4°C, sendo que para confirmação da fragmentação das amostras foi corrido um gel de agarose a 4%.

Terminada a fragmentação, as amostras foram mantidas no gelo e foram adicionados 89 µL do *Labeling Master Mix* em cada uma delas para a marcação do DNA. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 4 horas, 95°C por 15 minutos e mantidas no gelo.

Após, foi preparado o *Hybridization Master Mix* e este foi adicionado na amostra para que ocorresse a hibridação destas no *chip*, sendo que nesta etapa o DNA é denaturado novamente a 95°C por 10 minutos e as amostras são mantidas a 49°C. As amostras foram aplicadas nos *chips* e estes, então, foram colocados no forno de hibridação com uma rotação de 60 rpm e temperatura de 50°C, e as amostras ficaram hibridando por 16 a 18 horas.

Terminada a hibridação, os *chips* foram lavados e corados (*streptavidin phycoerythrin – SAPE / anti-streptavidin biotinylated antibody stain / SAPE*) por 3 horas. Finalmente os *chips* foram escaneados pelo *GeneChip® Scanner*, os dados foram extraídos pelo *software Genotyping Console Software® v3.0.2* e os resultados analisados pelo *Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software®*, sendo que a intensidade do sinal gerado foi proporcional ao número de cópias da sequência complementar no genoma.

- ***Illumina:***

O *HumanCytoSNP-12 BeadChip®* compreende um painel de triagem do genoma com sondas ligadas a *beads* magnéticas, que estão distribuídas aleatoriamente por toda lâmina, sendo que cada *bead* apresenta várias sequências da mesma sonda e cada lâmina possui um mapa de localização destas *beads*.

Este *array* inclui cerca de 300.000 sondas de oligonucleotídeos de 50-mer, com um espaçamento médio de 9,7 kb entre elas. Estas sondas cobrem todo o genoma e são consideradas sondas alvo para todas as regiões de importância

citogenética conhecidas, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e dos cromossomos sexuais.

Protocolo da técnica de *array* – *Illumina*:

A técnica de SNP-*array* da plataforma *Illumina* foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia na ESALQ-USP.

Para a realização do experimento foram utilizados 4 µL de DNA a uma concentração final de 50 ng/µL. As amostras extraídas foram transferidas para uma placa MAS3 específica para que o DNA pudesse ser denaturado quimicamente e logo após neutralizado por reagentes específicos fornecidos no *kit*. Após, foi realizada a etapa de amplificação genômica, na qual as amostras foram incubadas a 37°C por 20-24 horas.

Na próxima etapa, pós-PCR, o DNA primeiramente foi fragmentado por ação de uma enzima (reagente FMS) e após foi precipitado usando os reagentes 2-propanol e PM1. A placa com as amostras foi mantida invertida por pelo menos 1 hora a temperatura ambiente para que o *pellet* pudesse secar. Após, o DNA precipitado foi ressuspensionado em um reagente denominado RA1 e aplicado no *BeadChip*. Este foi incubado a 48°C por aproximadamente 16 horas para que ocorresse a hibridação das amostras nas sondas específicas.

Terminada a etapa da hibridação, o *BeadChip* foi lavado e preparado para o processo de coloração. Nesta etapa o DNA não hibridado foi removido e nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos foram adicionados.

Após a lavagem, a intensidade dos sinais foi medida por um *laser scanner*, o *HiScanSQ*® (*Illumina technology*), e a análise foi realizada com o auxílio de softwares específicos disponibilizados pelo fabricante, como o *GenomeStudio* v2010.1® e o *KaryoStudio* v1.4.3.0 *Build 37*® (CNV *Plugin* v3.0.7.0).

3.2.5. Análise final dos dados

Para este trabalho foram utilizadas as informações da análise citogenômica dos pacientes com MC/ADNPM, avaliados pelas técnicas de FISH, MLPA e/ou *array* em diferentes projetos para um estudo comparativo entre as diferentes metodologias.

Todos os resultados alterados foram checados por reações independentes e comparados aos bancos de dados:

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

Essa consulta aos bancos de dados foi realizada para identificação de CNVs benignas, patogênicas e as VOUS. As CNVs consideradas benignas estavam presentes em amostras normais consideradas polimórficas e as consideradas potencialmente patogênicas estavam presentes em genes causativos de alterações clínicas. Quando estas não envolviam genes conhecidos, mas poderiam estar correlacionados com as alterações fenotípicas dos pacientes foram consideradas como VOUS.

Quando necessário, as amostras dos pais foram avaliadas para uma melhor classificação das alterações encontradas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados 78 pacientes com MC/ADNPM por pelo menos uma das técnicas citogenômicas (FISH, MLPA e *array*), sendo que todos os pacientes apresentavam cariótipo normal ou com alguma alteração indeterminada por bandamento G, mas que impossibilitava o diagnóstico conclusivo.

Todos os resultados avaliados por meio das três técnicas citogenômicas foram descritos no Quadro 7 do Anexo I, sendo que a menor alteração encontrada pelo *array* foi de cerca de ~1 kb (paciente 21), detectada pelo *chip* HD da *Affymetrix* e a maior foi de ~72 Mb (paciente 59), detectada pela plataforma da *Illumina* (Quadro 8, Anexo J).

Observando o conjunto dos resultados, foi verificado que ~28,2% (22/78) dos pacientes foram avaliados por meio das três técnicas (FISH + MLPA + *array*), sendo que ~81,8% destes resultados (18/22 pacientes) foram concordantes e quatro pacientes tiveram o resultado de uma das técnicas inconclusivo.

Dos pacientes com resultados concordantes (~81,8% – 18 pacientes), ~27,8% (5/18) deles não apresentaram alterações por nenhuma das técnicas, ~38,9% (7/18) apresentaram até três alterações detectadas pela técnica de *array* e resultado normal pela técnica de MLPA e FISH, ~11,1% (2/18) dos pacientes tiveram resultados alterados por meio da técnica de *array* e MLPA e normal pela FISH, e ~22,2% (4/18) dos pacientes apresentaram resultados alterados por meio das três técnicas avaliadas (Figura 6, Gráfico 1).

Dos pacientes com resultado inconclusivo para umas das técnicas, um deles (paciente 69) apresentou duas alterações na MLPA (uma alteração no *kit* P036 e uma alteração no *kit* P070) que não foram consideradas na técnica de *array* e FISH (ambas normais), sendo que na exata posição da sonda de MLPA não temos sonda de *array*, e três pacientes (paciente 04, 07 e 40) tiveram resultados inconclusivos apenas por meio da técnica de FISH, sendo que no paciente 04 foi encontrada uma alteração no *array* e nenhuma na MLPA, no

paciente 07 uma alteração no *array* e uma na MLPA e no paciente 40 foi encontrada duas alterações na técnica de *array* e nenhuma na MLPA (Gráfico 1).

O restante compreendeu ~71,8% (56/78) da casuística e os pacientes foram avaliados por meio das técnicas de *array* e MLPA. Destes, ~92,9% (52/56) tiveram resultados concordantes, sendo que ~17,3% (9/52) não tiveram nenhuma alteração em ambas as técnicas, ~53,8% (28/52) tiveram resultados alterados pela técnica de *array* e normais pela técnica de MLPA, e ~28,9% (15/52) estavam alterados por ambas as técnicas (Figura 6, Gráfico 1).

Dos pacientes com alterações nas técnicas de MLPA e *array*, em 2 casos (paciente 19 e 22) a MLPA permitiu redefinir as conclusões tiradas por meio da técnica de *array*. No caso 19 verificamos uma alteração na MLPA e não no *array*, duplicação do gene *FZD9*, confirmada por corridas independentes de MLPA, e no caso 22 foi possível redefinir o ponto de quebra determinado pelo *array*, pois a sonda de MLPA estava posicionada posteriormente à última sonda de *array* detectada e entre elas não havia nenhuma sonda, ou seja, pelo *array* o ponto de quebra seria 190,790,881 e com a MLPA passou a ser ~190,862,226.

Os outros pacientes avaliados pela técnica de *array* e MLPA compreendeu ~3,6% (2/56) (paciente 45 e 55) e deverão ser melhores avaliados por outras técnicas moleculares para conclusão do caso, pois ainda que a alteração encontrada em ambas as técnicas seja concordante, o ponto de quebra visualizado pelo *array* não corresponde exatamente com a localização genômica da sonda da MLPA, e entre as estas duas sondas existem várias sondas de *array*.

Alguns resultados de MLPA foram inconclusivos, porém eles não interferiram na comparação das técnicas, já que as regiões pesquisadas na MLPA se repetiam entre os diversos *kits* utilizados.

Uma visão mais clara da análise geral dos resultados pode ser obtida analisando o fluxograma e o gráfico a seguir (Figura 6, Gráfico 1).

Figura 6 – Fluxograma dos resultados obtidos a partir da comparação das técnicas citogenômicas – FISH, MLPA e *array*, em 78 pacientes. A primeira coluna refere-se aos resultados da comparação das três técnicas utilizadas; a segunda à comparação entre a técnica de MLPA e *array*; e a terceira coluna refere-se aos resultados inconclusivos ou discordantes

Gráfico 01 – Resultados obtidos na comparação das técnicas citogenômicas avaliadas (FISH, MLPA e *array*)

NOTA: O eixo X representa os resultados normais e alterados das técnicas comparadas e o eixo Y o número de pacientes.

4.1. Resultados pela técnica de FISH

A técnica de FISH foi aplicada no diagnóstico de 22 pacientes que apresentavam fenótipos característicos de alguma das síndromes de microdeleção/microduplicação e/ou para confirmar e verificar a localização de alguma alteração específica.

Foram utilizadas diversas sondas, sendo que em ~4,5% (1/22) dos pacientes avaliados por esta técnica foram utilizadas as sondas para o cromossomo 4 (pesquisa da região 4p16.3), em ~9,1% (2/22) as sondas para o cromossomo 5 (pesquisa da região 5q35), em mais ~9,1% (2/22) destes pacientes foi pesquisada a região subtelomérica do cromossomo 9p, em ~18,2% (4/22) foram utilizadas as sondas para o cromossomo 7 (pesquisa da região 7q11.23), em outros ~4,5% (1/22) dos pacientes foram utilizadas as sondas para o cromossomo 17 (pesquisa da região 17p13.3) e em ~54,6% (12/22) deles foram utilizadas as sondas para o cromossomo 22 (em 9 pacientes foi pesquisada a região 22q11.2 e em 3 a região 22qter) (Quadro 9).

A maioria dos resultados para as regiões pesquisadas foram normais (~68,2% – 15/22 pacientes), porém ~18,2% (4/22) dos pacientes avaliados foram considerados alterados. Dentre as alterações, foram consideradas três deleções, uma no 4p16.3 correspondente à síndrome de Wolf-Hirschhorn (paciente 28), uma na região 7q11.23 correspondente à síndrome de Williams-Beuren (paciente 30) e outra deleção na região 9pter (paciente 24), e foi visualizada também uma duplicação na região subtelomérica 9pter (paciente 56) (Quadro 9, Figura 7).

Em ~13,6% (3/22) dos pacientes avaliados por FISH não foi possível concluir o resultado por falta de crescimento da cultura, *debris* celulares ou pelo excesso de hibridação das sondas em locais inespecíficos (Quadro 9, Figura 7).

Quadro 9 – Resultados obtidos por meio da técnica de FISH

Nº de pacientes	Região pesquisada	Resultado
1	4p16.3	deleção
2	5q35	normal
1	9p24.3	deleção
1		duplicação
2	7q11.23	normal
1		deleção
1		inconclusivo
1	17p11.2	normal
8	22q11.2	normal
1		inconclusivo
2	22qter	normal
1		inconclusivo

NOTA: A primeira coluna representa o número de pacientes avaliados por esta técnica; a segunda a região cromossômica na qual foi pesquisada alguma alteração; e a terceira coluna refere-se ao resultado obtido.

Figura 7 – Fluxograma com os resultados normais e alterados visualizados por meio da técnica de FISH

4.2. Resultados pela técnica de MLPA

A avaliação da técnica MLPA por meio dos *kits* P064 (específico para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação), P036 e P070 (para as regiões subteloméricas de todos os cromossomos) foi realizada em todos os 78 pacientes. Quando necessário, devido a uma forte suspeita clínica, o paciente também foi avaliado pelos *kits* P250 e P356 específicos para a síndrome de

DiGeorge ou pelo *kit* P029 específico para a síndrome de Williams-Beuren.

A análise molecular por meio desta técnica não detectou alterações em ~65,4% (51/78) dos pacientes, sendo que em sete deles um ou dois *kits* foram inconclusivos, mas não influenciaram na avaliação e conclusão dos resultados por meio da técnica de MLPA (pacientes 05, 13, 15, 16, 60, 65 e 66) (Gráfico 2, Figura 8).

Gráfico 2 – Resultados obtidos por meio da técnica de MLPA utilizando diversos *kits* disponíveis comercialmente

NOTA: A cor rosa representa os resultados sem alterações quando avaliados pelos *kits* para as síndromes de microdeleção/microduplicação e para os subtelômeros de todos os cromossomos; a cor azul representa os resultados sem alterações, porém com resultado inconclusivo em um dos *kits* avaliados; e a cor verde refere-se aos resultados alterados em pelo menos um dos *kits* utilizados.

Os casos em que foi detectada alguma alteração em pelo menos um dos *kits* utilizados compreendem ~34,6% (27/78) dos pacientes (Gráfico 2, Figura 8).

Dentre estes pacientes, foram detectadas ~14,8% (4/27) de alterações pelo *kit* P064, correspondentes à deleção da síndrome de Williams-Beuren (pacientes 30 e 19) e à deleção de 22q11.2 (pacientes 17 e 03), típica em um paciente e atípica em outro para cada uma das regiões, sendo confirmadas em alguns casos pelos *kits* específicos P029, P250 e/ou P356 (Quadro 10, Gráfico 3, Figura 8).

Quadro 10 – Resultados alterados na avaliação do *kit* P064 para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação por meio da técnica da MLPA

Paciente	Alterações	Genes alterados
30	del 7q11.23 típica	<i>FZD9, STX1A, ELN, LIMK1, CYLN2</i>
19	del 7q11.23 atípica	<i>FZD9</i>
17	del 22q11.2 típica	<i>CLTCL1, CDC45, CLDN5, ARVCF, KLHL22, SNAP29</i>
03	del 22q11.2 atípica	<i>SNAP29</i>

NOTA: A primeira coluna refere-se ao registro dos pacientes; a segunda coluna às alterações e sua localização cromossômica; e a terceira aos genes que estavam deletados.

Nas alterações apenas subteloméricas, observadas em ~55,6% (15/27) dos pacientes, foi detectada uma deleção isolada em dois pacientes (paciente 28 e 37), uma duplicação isolada em outro (paciente 27), duas duplicações em cromossomos distintos em um quarto paciente (paciente 25), um outro tinha duas deleções, uma detectada pelo *kit* P036 e a outra pelo P070 (paciente 69), e os 10 pacientes restantes apresentaram uma deleção concomitante a uma duplicação. Todas estas alterações estavam presentes em subtelômeros de cromossomos diferentes (Quadro 11, Gráfico 3, Figura 8).

Em alguns destes pacientes com alterações subteloméricas foram utilizados também os *kits* P250 e/ou P356 (em 6 pacientes) e tivemos quatro resultados inconclusivos em um ou dois *kits* avaliados (paciente 24, 27, 61 e 63), mas que não influenciaram no resultado final da técnica de MLPA.

Quadro 11 – Resultados alterados na avaliação subtelomérica (*kits* P036 e P070) por meio da técnica da MLPA

Paciente	Alterações subteloméricas		Genes alterados	
28	del 4p16.3		PIGG	
37	del 4q35.2		TRIML2, FRG1	
27	dup 7q36.3		VIPR2	
25	dup 5p15.33	dup 14q11.2-cen	PDCD6, CCDC127	CCNB1IP1, PARP2
69	del 16p13.3 (P036)	del 19p13.3 (P070)	POLR3K	PPAP2C
24	del 9p24.3	dup 18q23	DMRT1, DOCK8	RBFA, CTDPI
42	del 7p22.3	dup 12q24.33	ADAP1, SUN1	ZNF10
43	del Yq12	dup 5p15.33	VAMP7	PDCD6, CCDC127
44	del 9p24.3	dup 3q29	DMRT1, DOCK8	BDH1, KIAA0226
55	del 4q35.2	dup Xq28	TRIML2, FRG1	VAMP7
56	del 18q23	dup 9p24.3	RBFA, CTDPI	DMRT1, DOCK8
58	del 4p16.3	dup 8p23.3	PIGG	FBXO25
59	del 7q36.3	dup 4q35.2	VIPR2	TRIML2, FRG1
61	del 4q35.2	dup 2p25.3	TRIML2, FRG1	ACP1
63	del 16p13.3	dup 16q24.3	POLR3K, DECR2	GAS8

NOTA: A primeira coluna corresponde ao registro dos pacientes; a segunda coluna refere-se às alterações e à localização cromossômica das CNVs encontradas; e a terceira aos genes que estavam deletados ou duplicados.

O teste de MLPA também permitiu detectar alterações em ambos os *kits* para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação e para as regiões subteloméricas de todos os cromossomos. Essas alterações foram encontradas em ~25,9% (7/27) dos pacientes estudados e estão listadas na tabela a seguir (Quadro 12, Gráfico 3, Figura 8):

Quadro 12 – Resultados alterados em ambos os *kits* para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação (P064) e para as regiões subteloméricas de todos os cromossomos (P036 e P070) avaliados por meio da MLPA

Paciente	Alterações encontradas		Genes alterados
	P064	P036 / P070	
62	del 7q11.23 – SWB atípica (+P029)	dup Yp11.32 / dup Yq12	<i>STX1A, ELN, LIMK1, CLIP2, SHOX, VAMP7</i>
39 e 57	dup 5q35.3 – S. Sotos	del 2q37.3 / dup 5q35.3	<i>NSD1, CAPN10, ATG4B, GNB2L1</i>
23	dup 15q11.2 – S. Prader-Willi/Angelman	dup 12q24.33 / dup 15q11.2-cen	<i>MKRN3, NDN, UBE3A, GABRB3, ZNF10</i>
49	del 1p36 atípica	del 1p36.33	<i>TNFRSF18, TNFRSF4, SCNN1D, GNB1, SKI, PANK4</i>
45	del 17p13.3 – S. Miller-Dieker atípica	del 17p13.3 / dup 17q25.3	<i>HIC1, METTL16, RPH3AL, TBCD, SECTM1</i>
22	dup 5q35.3 – S. Sotos	del 4q35.2 / dup 5q35.3	<i>NSD1, TRIML2, FRG1, GNB2L1</i>

NOTA: A primeira coluna corresponde ao registro dos pacientes; a segunda coluna refere-se às alterações e sua localização cromossômica; e a terceira aos genes que estavam deletados ou duplicados.

E foi detectada uma duplicação atípica (gene *PRODH*) apenas pelo *kit* P356, específico para o cromossomo 22, que corrobora com o resultado do *array* (paciente 07).

O gráfico e o fluxograma a seguir reúne todas as informações obtidas na técnica de MLPA por meio dos diversos *kits* avaliados (Gráfico 3, Figura 8).

Gráfico 3 – Resultados alterados na avaliação por meio da técnica de MLPA utilizando diversos *kits*

NOTA: Em rosa estão os resultados alterados no *kit* para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação (P064); em azul as alterações subteloméricas (P036 e P070); em verde os pacientes alterados tanto para os *kits* das principais síndromes de microdeleção/microduplicação (P064) e subteloméricos (P036 e P070); e em amarelo a alteração apenas no *kit* P356, específico para o cromossomo 22.

Figura 8 – Fluxograma representando todos os resultados obtidos na avaliação por meio da técnica de MLPA utilizando diversos *kits* disponíveis comercialmente

4.3. Resultados pela técnica de *array*

Neste estudo foram avaliados 78 pacientes por diferentes plataformas e densidades de sondas, de acordo com a disponibilidade no laboratório, sendo que todas são consideradas pela literatura como eficazes para a substituição da cariotipagem clássica. As porcentagens dos pacientes avaliados em cada plataforma por diferentes lâminas/*chips* podem ser observadas no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Avaliação de 78 pacientes por meio da técnica de *array* utilizando diversas plataformas

NOTA: Em rosa e roxo estão os resultados de *array* obtidos por meio da plataforma da *Affymetrix* com o *chip* *CytoScan* HD e *Wide Human* SNP 6.0, respectivamente; em verde e amarelo está representado os resultados da *Agilent* com as lâminas 105K e 180K, respectivamente; e em azul estão os resultados obtidos pela plataforma da *Illumina* com o *HumanCytoSNP* - 12.

Dos pacientes analisados, ~19,2% (15/78) apresentaram resultados considerados normais, ou seja, sem nenhuma alteração, e foram avaliados pelas plataformas da *Agilent* 180K (2/15 – pacientes 77 e 78) e da *Illumina* (13/15 – pacientes 64 até 76). Os outros pacientes (~80,8% – 63/78) tiveram uma ou mais alterações, que foram classificadas como benignas, patogênicas, VOUS, e/ou LOH, que pode estar relacionada com doenças recessivas (Gráfico 5, Gráfico 6,

Quadro 8, Anexo J).

Gráfico 5 – Resultados normais e alterados obtidos por meio da avaliação da técnica de *array*

NOTA: A cor rosa representa os resultados normais do *array* e a azul os resultados alterados.

Os pacientes que apresentaram apenas um tipo específico de alteração somam ~63,5% (40/63) dos pacientes alterados, sendo que ~23,8% (15/63) tiveram uma ou duas alterações consideradas benignas, ~27% (17/63) tiveram de uma a três alterações consideradas como patogênicas e ~12,7% (8/63) também tiveram de uma a três alterações, mas neste caso classificadas como VOUS.

O restante dos pacientes teve duas ou mais alterações e estas foram classificadas de duas ou três maneiras diferentes. Os pacientes que tiveram alterações classificadas como benignas ou patogênica e concomitantemente VOUS somam ~12,7% (8/63) dos pacientes com alguma alteração, além destes ~6,3% (4/63) tiveram as alterações classificadas como benignas, patogênicas ou VOUS juntamente com regiões de LOH, ~8,0% (5/63) apresentaram alterações benignas e patogênicas, e ~9,5% (6/63) dos pacientes alterados tiveram as denominações benignas, patogênicas e VOUS para as suas alterações (Gráfico 5).

Gráfico 6 – Classificação dos resultados obtidos por meio da técnica de *array*

NOTA: Os resultados considerados benignos estão representados pela cor rosa; os considerados patogênicos estão em azul; as VOUS em verde; os pacientes representados em amarelos possuem alterações benignas ou patogênicas concomitantes com VOUS; em roxo estão os pacientes que apresentaram alterações benignas, patogênicas ou VOUS junto com regiões de LOH; em verde escuro os que tinham alterações benignas e patogênicas; e o laranja representa as alterações benignas, patogênicas e VOUS no mesmo paciente.

Os pacientes que apresentam apenas alteração sem um significado clínico importante até o momento (benignas e VOUS) somam ~38,5% (30/78) do total de pacientes, e ~42,3% (33/78) dos pacientes possuem pelo menos uma alteração patogênica e correlacionada com seu fenótipo (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Resultados obtidos por meio da técnica de *array*

NOTA: Em rosa estão os pacientes que não apresentaram alteração; em azul os que tinham apenas alterações benignas ou VOUS; e em verde estão os casos que tiveram pelo menos uma alteração patogênica.

Dos pacientes com CNVs patogênicas diversas e em regiões distintas, ~42,4% (14/33) tinham uma única alteração considerada patogênica, ~45,5% (15/33) destes pacientes incluíam duas alterações com significado clínico em regiões diferentes, e ~12,2% (4/33) apresentaram três ou cinco alterações patogênicas, consideradas rearranjos complexos (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Distribuição em porcentagem da quantidade CNVs patogênicas identificadas nos pacientes por meio da técnica de *array*

NOTA: Os pacientes que possuem apenas uma CNV patogênica estão em rosa; os que apresentam 2 CNVs patogênicas estão em azul; e os que possuem duas ou cinco estão representados por verde.

O fluxograma abaixo reúne todas as informações em relação à classificação dos resultados obtidos na técnica de *array* (Figura 9).

Figura 9 – Fluxograma representando a classificação dos resultados obtidos na avaliação por meio da técnica de array

Em relação ao tamanho das alterações, podemos notar uma maior concentração de pacientes que apresentaram CNV benignas variando entre 100 a 500 kb, de CNVs patogênicas maiores que 1 Mb e de VOUS também variando entre 100 a 500 kb (gráfico 9).

Gráfico 9 – Tamanho das CNVs encontradas na técnica de *array*

NOTA: As alterações benignas estão representadas em rosa; as patogênicas em azul; e as VOUS em verde.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estabelecer um diagnóstico clínico-molecular inequívoco para pacientes portadores de MC/ADNPM é essencial para que possa ser realizada uma relação genótipo-fenótipo mais adequada, além de melhorar o aconselhamento genético.

Com os avanços das técnicas citogenômicas, diferentes síndromes estão sendo avaliadas mais detalhadamente, assim, para algumas alterações, genes específicos agora são apontados como responsáveis pela maioria das características clínicas em uma determinada síndrome, enquanto que para outras, um aumento do número de regiões críticas relacionadas a características clínicas específicas foram possíveis de serem determinadas (Feenstra et al., 2006).

Neste estudo, a técnica de FISH não detectou alterações em 15 dos 22 pacientes avaliados. Nestes casos, sondas *locus* específicas foram utilizadas para a avaliação de regiões alvo que correspondiam a alguma síndrome de microdeleção que foi suspeitada durante a avaliação médica. Das quatro alterações detectadas, duas (deleção do 4p16.3 e do 7q11.23) foram em regiões correspondentes a síndromes específicas e duas foram por meio de sondas subteloméricas (deleção e duplicação do 9p).

Em um estudo realizado por Rauch et al. (2006) a taxa de detecção utilizando sondas de FISH *locus* específicas foi de 1,3% para as síndromes de microdeleção/microduplicação comuns (síndrome de Prader-Willi, síndrome de Williams-Beuren e síndrome da deleção do 22q11.2).

Essa taxa de detecção pode ser maior se a característica fenotípica dos pacientes avaliados for típica de alguma síndrome já descrita ou se a FISH for utilizada para a caracterização molecular de um cariótipo anormal com diagnóstico clínico final indefinido (por exemplo, a presença de um cromossomo marcador) e, dessa forma, a análise molecular seria direcionada a um alvo específico, sendo que a FISH apenas detecta segmentos interrogados, não fornecendo informações do resto do genoma (Shaffer e Bejjani, 2006; Tsuchiya,

2011).

Em um trabalho utilizando sondas para pesquisa de alterações subteloméricas, foram detectados 10% de alterações em diversos cromossomos e a FISH foi considerada um importante teste para o diagnóstico de pacientes com deficiência intelectual inexplicável e alterações no desenvolvimento (Fan et al., 2001). Palomares e colaboradores citam uma taxa que varia entre 1,4 e 16,3% na literatura, dependendo do critério de seleção dos pacientes, e encontraram 10% de pacientes com alterações subteloméricas, sendo que mais da metade destes pacientes tinham duas alterações em cromossomos distintos (Palomares et al., 2006).

Neste estudo, a taxa de detecção utilizando sondas para as síndromes de microdeleção/microduplicação e sondas para as regiões subteloméricas foi de ~9,1% para cada uma delas (~18,2% de detecção geral), corroborando com alguns dados da literatura e na maioria das vezes superando as taxas descritas.

Além dos resultados normais e alterados também foram considerados três casos inconclusivos devido à falta de crescimento da cultura em um deles e nos outros dois devido aos *debris* celulares e excesso de hibridação e hibridação inespecífica por toda a lâmina. Nesses casos não foi possível repetir a cultura celular, pois os pacientes não compareceram para uma nova coleta de sangue periférico por diferentes motivos: residirem em local muito afastado, dificuldades de locomoção e/ou financeiras e ainda disponibilidade de horário.

A maior dificuldade da técnica de FISH é ter uma qualidade adequada da cultura (crescimento celular e ausência de “sujeira” ou *debris* celulares), além disso esta é uma técnica trabalhosa e dependente de um profissional especializado para a análise e avaliação das alterações, evitando resultados falso-positivos ou negativos. Também é muito difícil avaliar pela FISH pequenas duplicações em *tandem*, já que estas sequências podem estar localizadas muito próximas e dificultar a avaliação por intensidade de sinal.

Também é preciso considerar que a técnica de FISH é dependente de uma boa estratégia para a escolha das sondas mais apropriadas para a identificação de alterações em regiões específicas do genoma (Shaffer e Bejjani, 2006; Tsuchiya, 2011). Além disso, a hipótese clínica adequada é um componente

crucial para o sucesso da aplicação do teste de FISH.

Atualmente a técnica de MLPA tem ganhado destaque para a detecção das principais síndromes de microdeleção/microduplicação e para a pesquisa de subtelômeros por ser uma técnica rápida e capaz de detectar as alterações típicas correlacionadas com determinados fenótipos (por exemplo, a síndrome de Williams-Beuren ou a deleção do 22q11.2), além de detectar as deleções pequenas e/ou atípicas e duplicações nas regiões pesquisadas (Cho et al., 2009). Sua capacidade de avaliar mais de 45 regiões alvo em uma única reação, sem precisar do cultivo de células, faz dela uma técnica de baixo custo e muito utilizada para a validação de outras técnicas, como por exemplo, o *array*-CGH (Jennings et al., 2011).

A análise por meio da técnica de MLPA, utilizando os *kits* P064 e/ou P036 e P070, detectou alterações em aproximadamente 34,6% dos pacientes. Jehee et al. (2011), utilizando a mesma combinação de *kits* de MLPA, encontraram 21,8% de alterações patogênicas em 261 pacientes com múltiplas anormalidades congênicas e deficiência intelectual.

Em um trabalho, realizado em 2007, com 258 pacientes portadores de deficiência intelectual e distúrbios, a taxa de detecção de alterações utilizando uma combinação de sondas para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação e de sondas subteloméricas foi de 10,1%, sendo que 5,8% foram de alterações apenas nas regiões correlacionadas a síndromes e 5,0% de alterações subteloméricas (Kirchhoff et al., 2007).

Nos pacientes deste estudo, as alterações observadas apenas pelo *kit* específico para as principais síndromes de microdeleção/microduplicação (P064) correspondem a ~5,1% do total das amostras, ou ~14,8% dos resultados alterados, e referem-se à síndrome de Williams-Beuren e deleção do 22q11.2. Já as alterações apenas subteloméricas representam ~19,2% de toda a casuística avaliada pela MLPA ou ~55,6% dos pacientes alterados. Em um estudo semelhante, a taxa de detecção de alterações de microdeleção/microduplicação mais comuns foi de 6,6% e de alterações subteloméricas foi de 7,3% (Pohovski et al., 2013).

A porcentagem de detecção de mudança do número de cópias no genoma

pela MLPA depende dos critérios de seleção dos pacientes avaliados, e dados obtidos neste trabalho estão corroborando com dados da literatura para a avaliação das regiões correspondentes às síndromes de microdeleção/microduplicação e para as regiões subteloméricas os valores estão superiores àqueles descritos por diversos autores.

O estudo subtelomérico realizado por Koolen et al. (2004) revelou uma taxa de 6,7% de alterações em 210 pacientes com deficiência intelectual idiopática. Dois anos depois, Palomares et al. (2006) detectaram 10% de alterações em pacientes avaliados por *kits* subteloméricos com as mesmas características fenotípicas.

Com exceção de três resultados, todos os pacientes avaliados que apresentaram apenas anormalidades subteloméricas tinham duas alterações, uma deleção concomitante a uma duplicação em cromossomos distintos ou duas deleções ou duplicações. Esse conjunto de alterações em um mesmo paciente pode ser devido a um rearranjo complexo e translocações entre os cromossomos alterados, ou a regiões de instabilidade e suscetibilidade a rearranjos por processos de reparação de quebras.

No presente estudo também foi detectada alterações conjuntas nos três principais *kits* utilizados (P064, P036 e P070), totalizando ~25,9% de mudanças no número de cópias entre os resultados alterados. Essas alterações concomitantes podem ser devido a alguma síndrome de microdeleção estar localizada próximo ao telômero do cromossomo, como por exemplo, no caso da deleção do 1p36, ou a rearranjos complexos entre cromossomos diferentes devido a regiões de instabilidade e a micro homologia entre elas.

Além das alterações encontradas nos principais *kits* utilizados, também foi possível identificar uma alteração atípica pelo *kit* P356 envolvendo um único gene (2 éxons avaliados). Essas alterações são raras de serem detectadas, pois envolvem genes ou éxons específicos condizentes com poucas características clínicas ou com algum fenótipo presente na maioria dos pacientes, dificultando o direcionamento para o *kit* correto.

Uma limitação importante da MLPA é que a intensidade do sinal das sondas varia conforme as características do DNA utilizado, que incluem o método de extração, o tempo de armazenamento, a solução de eluição, o grau de degradação (se presente) e a presença de diversos contaminantes, como reagentes de extração, proteínas, RNAs, sais, dentre outros. Estas influências podem ser minimizadas se todas as amostras forem preparadas pelo mesmo método e mesmo indivíduo, porém eliminar este viés nem sempre é possível, pois muitas vezes as amostras são enviadas de outras localidades e o tempo de armazenamento e extração do DNA acaba sendo diferente do padrão, podendo originar artefatos durante a análise, em que apenas um profissional especializado conseguiria identificar (Kozlowski et al., 2008).

Na avaliação por meio da técnica de MLPA, 11 pacientes apresentaram resultados inconclusivos em um ou dois *kits* utilizados, porém nenhum destes resultados foram limitantes para a detecção de alguma alteração, já que as regiões pesquisadas se repetem em outros *kits* utilizados. Esse dado reforça a importância da utilização dos diferentes *kits* combinados, sendo que um *kit* atuaria como controle do outro, confirmando a alteração encontrada e excluindo resultados falso-positivos e negativos (Palomares et al., 2006; Pohovski et al., 2013).

No estudo realizado por Marenne e colaboradores a MLPA foi utilizada para validar os dados obtidos por *array*, sendo que o DNA de 56 pacientes foi analisado pela MLPA em duas reações independentes fornecendo uma taxa de concordância de 97,25%, ou seja, é uma técnica reprodutível (Marenne et al., 2011).

Atualmente, o tamanho e os pontos de quebra das alterações cromossômicas podem ser determinados com uma maior precisão, acurácia e sensibilidade por meio das técnicas de *arrays* (Feenstra et al., 2006; Manning e Hudgins, 2010).

Todos pacientes incluídos na casuística deste estudo foram avaliados por meio da técnica de *array*, conforme a disponibilidade de plataforma ou lâminas/*chips* no laboratório. As lâminas/*chips* diferem entre si na tecnologia empregada (CGH, oligonucleotídeos ou *beads*) e na quantidade e no

espaçamento das sondas distribuídas por todo o genoma. Sendo que as tecnologias com um maior número de cobertura do genoma fornecem um ponto de quebra mais exato das alterações, além de diagnosticar micro alterações ou diversas CNVs, as quais anteriormente eram consideradas como uma única alteração, por exemplo, uma região normal intercalada por duas regiões alteradas. Nesses casos, *arrays* de baixa cobertura podem considerar essas alterações como uma única deleção e não como um rearranjo complexo que pode refletir em uma variação do fenótipo do paciente (Shaffer e Bejjani, 2006; Manning e Hudgins, 2010; Vissers et al., 2010).

Ao todo foram avaliadas 78 amostras, sendo que todas as diferentes tecnologias de *arrays* empregadas mostraram-se satisfatórias para a detecção de variações no genoma, que na maioria dos casos corroboraram com as características clínicas de cada paciente.

As amostras que apresentaram resultados considerados normais, ou seja, sem alteração compreendeu ~19,2% do total dos pacientes, sendo que esta taxa é bem menor com a descrita na literatura. Vallespín et al., em 2013, avaliaram 540 amostras (pacientes com deficiência intelectual, autismo e/ou múltiplas malformações congênitas) por meio de um *array* customizado com uma cobertura média de ~43 kb, sendo que em 31,85% dos pacientes nenhuma CNV foi detectada. Neste estudo as amostras consideradas normais foram avaliadas pelas plataformas da *Agilent* 180K (2/15 pacientes) e da *Illumina* (13/15 pacientes), ambas com uma taxa elevada de cobertura do genoma, sendo que apresentaram resultados normais devido a uma maior quantidade de pacientes avaliados e que não tinham uma suspeita clínica estabelecida, principalmente pela plataforma da *Illumina* (58 amostras). Esses pacientes deverão ser melhores avaliados e encaminhados para testes direcionados, como por exemplo, pesquisa de mutações em genes específicos ou ruptura de genes devido às translocações balanceadas, ou ainda o sequenciamento do exoma (Siggberg et al., 2012).

Na avaliação por *array* também foi possível identificar 33 amostras com pelo menos uma alteração considerada patogênica, ou seja, ~42,3% dos pacientes apresentaram CNVs com significado clínico importante, sendo que a

maioria deles apresentou apenas um ou duas alterações patogênicas em todo o genoma, combinadas ou não com outras alterações, somando, respectivamente, ~18,0% e ~19,2% da análise geral ou ~22,2% e ~23,8% dos pacientes com alguma alteração. As alterações consideradas complexas com três ou cinco CNVs patogênicas em regiões distintas também foram observadas em cerca de 5,1% das análises (~6,4% dos pacientes com alterações).

A taxa de detecção das alterações patogênicas visualizada neste estudo é muito superior à taxa descrita em diversos trabalhos. Rosenberg et al. (2006) investigaram 81 pacientes com deficiência intelectual e dismorfismos faciais por meio da técnica de *array*-CGH e concluíram que 16% deles tinham desequilíbrios cromossômicos patogênicos relacionados com o fenótipo, sendo que 4% dos pacientes avaliados tinham alterações de significado clínico incerto. No estudo realizado por Gijsbers e colaboradores (2009) utilizando diversas plataformas de *SNP-arrays* para a investigação de pacientes com deficiência intelectual e múltiplas anormalidades congênitas detectaram 22,6% de alterações entre os 318 pacientes avaliados e dessa forma o *array* foi considerado o teste mais adequado para se iniciar a investigação molecular de pacientes com essas características e cariótipo normal.

Hochstenbach et al. também recomendaram o *array* como o primeiro teste diagnóstico neste grupo de pacientes. Analisando diversos trabalhos, eles concluíram que a taxa de detecção pelo *array* seria de pelo menos 19% de alterações patogênicas. Outros trabalhos também apresentam taxas semelhantes de detecção de CNVs patogênicas, independentemente da plataforma selecionada para o diagnóstico de pacientes com deficiência intelectual e/ou malformações e/ou alterações neurológicas e cariótipo normal, sendo que Vallespín e colaboradores descreveram 33,33% dos pacientes com apenas uma anotação patogênica por amostra e uma taxa geral de 19,44% de alterações patogênicas (Hochstenbach et al., 2009; Siggberg et al., 2012; Vallespín et al., 2013).

Na análise realizada neste estudo, foi possível determinar alterações patogênicas que variaram de ~14 kb até ~72 Mb. As grandes alterações geralmente envolvem mais genes causativos de doenças, porém verificamos

que a gravidade do quadro clínico dos pacientes não está necessariamente diretamente correlacionada com o tamanho das alterações, mas sim com a localização e o conteúdo gênico, ou seja, uma alteração pequena pode refletir em um fenótipo mais grave devido à patogenicidade do gene alterado (Feuk et al., 2006). Mesmo tendo uma CNV patogênica de 14 kb, a maioria delas apresentaram um tamanho maior que 1 Mb, envolvendo diversos genes.

Com a implantação dos SNP-*arrays* foi possível identificar alterações não diagnósticas anteriormente pelo CGH-*arrays*. Na casuística deste trabalho foi possível identificar 4 pacientes que apresentaram regiões com LOH ou UPD, que podem estar correlacionadas com doenças recessivas (Gijssbers et al., 2009; Siggberg et al., 2012).

Além das alterações patogênicas e das regiões de homozigosidade alélica, nesta análise também foram identificados 26 pacientes que apresentavam pelo menos uma alteração considerada benigna, sendo que destes 5 pacientes tinham alterações patogênicas concomitantes, 4 tinham também VOUS e 2 apresentaram regiões de LOH além das CNVs benignas.

Também foram consideradas alterações nas quais não pudemos atribuir um significado clínico. As VOUS foram detectadas em cerca de 21,8% dos pacientes, sendo que destas quatro amostras avaliadas também tinham CNVs patogênicas, outras quatro tinham CNVs benignas e uma tinha diversas regiões de LOH. Neste estudo, estas alterações variaram de ~53 kb a ~1,6 Mb de tamanho, sendo que em um estudo realizado em 2013 (Vallespín et al.) a variação foi de ~17,5 a ~909 kb com uma taxa de 3% de detecção.

O maior desafio quando analisamos os resultados do *array* é determinar quais alterações são significantes para cada paciente, pois é muito comum encontrar mais de uma alteração por paciente e muitas vezes todas elas estariam influenciando no fenótipo. A presença de alterações benignas e VOUS está correlacionada com o aumento da densidade do *array* utilizado para o diagnóstico, assim *arrays* que possuem um maior número de sondas são capazes de identificar um maior número de microalterações, determinando o ponto de quebra dessas alterações com uma maior exatidão, porém a presença de regiões que envolvem genes sem uma função estabelecida ou regiões que

ainda não possuem genes descritos até o momento também irão aumentar (Miller et al., 2010; Vermeesch et al., 2012; Vallespín et al., 2013).

Alguns pais dos pacientes avaliados foram investigados por meio das técnicas de MLPA e *array* para melhor caracterização das alterações dos pacientes. Apenas um paciente teve uma pequena CNV herdada, que foi então classificada como benigna já que o gene envolvido não tinha relação com o fenótipo do paciente, a mãe não apresentava fenótipo e no DGV existem muitos pacientes descritos com essa alteração.

Todas as alterações foram verificadas em diversos bancos de dados internacionais disponíveis, como por exemplo o DGV, o DECIPHER e o UCSC, sendo que uma avaliação mais adequada das alterações encontradas nos nossos pacientes seria a criação de um banco de dados onde reunisse informações da população brasileira.

Em relação à avaliação dos pacientes por meio das três técnicas citogenômicas selecionadas neste projeto (FISH, MLPA e *array*), ~28,2% dos resultados foram concluídos. A maioria das amostras foi avaliada por duas técnicas: ~71,8% dos pacientes tiveram seu genoma avaliado por meio da técnica de MLPA e *array*.

A maioria dos resultados (~93,6%) foram concordantes entre si para as regiões pesquisadas, lembrando-se que nem todos os resultados foram iguais, já que a técnica de MLPA contempla cerca de 45 regiões específicas do genoma em cada *kit* disponível, portanto esta técnica depende de uma triagem clínica e direcionamento para uma sonda/alvo particular. A taxa de CNVs não detectadas pela MLPA em relação à técnica de *array* foi de 66,2%, sendo que a literatura descreve taxas maiores, com dados de 72-81% de não detecção de alterações da MLPA quando comparada com o *array* (Marenne et al., 2011).

Alguns dos resultados (~3,8%), apesar de terem a mesma alteração, foram discordantes em relação aos pontos de quebra do *array* com a posição da sonda da MLPA e para a conclusão do caso outras técnicas moleculares poderão ser aplicadas para reavaliação do exato ponto de quebra.

Todas as técnicas avaliadas neste estudo têm suas vantagens e

desvantagens dependendo da sua aplicação. Dessa forma, são necessárias uma interação clínico-laboratorial e uma equipe técnica multiprofissional especializada para direcionamento do diagnóstico molecular mais eficaz em relação ao custo-benefício (Figura 10, Anexo K).

Por vários anos, a técnica de FISH foi utilizada como método diagnóstico para alterações no genoma, as quais não podiam ser detectadas pelo cariótipo. Assim, sondas *locus* específicas eram designadas para a detecção de regiões que os médicos interrogavam em pacientes que apresentavam fenótipo condizente com alguma síndrome de microdeleção.

Atualmente a maior aplicação da técnica de FISH é na identificação da localização cromossômica de alguma alteração, como por exemplo, no caso de translocações. Porém esta metodologia possui um grande número de limitações: a primeira delas é o número restrito de regiões do genoma, na qual há sondas disponíveis, sendo que o paciente deve apresentar características típicas de uma das síndromes de microdeleção/microduplicação para ser avaliado por esta técnica; segundo, ela não detecta microdeleções e microduplicações em *tandem*; terceiro, ela é uma metodologia muito trabalhosa e depende de um técnico especializado para a realização da cultura e preparação metafásica dos cromossomos em lâmina; e quarto, o custo deste teste acaba superior ao das outras metodologias, pois só detecta uma única região e seu valor é semelhante ao da MLPA que detecta cerca de 45 regiões, e dessa forma, dificulta a implantação deste exame em países em desenvolvimento (Palamares et al., 2006; Stankiewicz e Beaudet, 2007; Cho et al., 2009; Jehee et al., 2011; Jennings et al., 2011).

A MLPA é utilizada para a detecção do número de cópias em diversas regiões do genoma. Ela é considerada uma metodologia rápida, confiável, de baixo custo (cerca de 7,5 vezes menor que o *array*), com uma alta sensibilidade e com a capacidade de identificar cerca de 45 regiões específicas em um único teste. Além dessas vantagens, a MLPA também elimina a necessidade de cultivo celular e preparação de lâminas, e é capaz de identificar deleções e duplicações atípicas e alterações em um único par de base (Kirchhoff et al., 2007; Cho et al., 2009; Jehee et al., 2011; Jennings et al., 2011).

Em contrapartida, esta técnica, assim como a FISH, também necessita de uma triagem clínica para o direcionamento a um *kit* específico, não sendo aplicável a todo o genoma, e diferente da FISH, esta técnica não detecta translocações equilibradas (Gijsbers et al., 2009; Jennings et al., 2011).

Já a metodologia do *array* avalia o genoma completo, podendo identificar alterações anteriormente não descritas, bem como pequenas deleções e duplicações. Porém a atual limitação do *array* é a incapacidade para detectar rearranjos balanceados, para fornecer a informação referente à posição cromossômica e a dificuldade em determinar o significado clínico das diversas alterações identificadas, além do custo elevado (aproximadamente R\$ 6.000,00) para implantação na rotina diagnóstica em países em desenvolvimento (Stankiewicz e Beaudet, 2007; Cho et al., 2009; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Gijsbers et al., 2009).

Assim, quando o *array* não é uma escolha disponível, a MLPA com a combinação dos três *kits* (P064, P036 e P070) é uma notável ferramenta para detecção de anormalidades em pacientes com MC/ADNPM (Jehee et al., 2011; Pohovski et al., 2013).

Os pacientes que tiveram resultados normais ou com alterações benignas podem apresentar fenótipos por terem rearranjos equilibrados ou mutações em genes específicos, sendo necessárias outras técnicas moleculares para a conclusão do diagnóstico, como por exemplo o sequenciamento do exoma, que pode detectar alterações em 80% dos pacientes com atraso no desenvolvimento de causa desconhecida e *array* normal (Vissers et al., 2010; Siggberg et al., 2012).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Foi possível comparar todas as técnicas citogenômicas utilizadas neste estudo e foi verificado que todas elas se mostraram satisfatórias para o diagnóstico de pacientes com MC/ADNPM, sendo que a FISH detectou ~18,2% de alterações, a MLPA ~34,6% e o *array* ~42,3% de alterações patogênicas e foi considerada a técnica mais eficiente para o diagnóstico de pacientes sem etiologia conhecida;
- Foi possível avaliar a viabilidade das técnicas, porém a MLPA, utilizando *kits* combinados, foi considerada a ferramenta com melhor custo-benefício para ser utilizada como um teste de triagem molecular;
- Foi possível avaliar os desafios da interpretação de todas as CNVs encontradas nos pacientes, sendo possível atribuir uma classificação diferente para cada tipo de CNVs encontrada (patogênicas, benignas ou VOUS) e que foram associadas ao fenótipo clínico de cada paciente estudado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o *array* seja a ferramenta mais eficiente para o diagnóstico de pacientes com MC/ADNPM, seu uso como primeiro teste diagnóstico nem sempre é o mais apropriado devido ao seu custo elevado ou a sua limitação em detectar inversões e translocações balanceadas. Dessa forma, o profissional deve ser capacitado para identificar se o fenótipo do paciente é característico de alguma síndrome de microdeleção e assim encaminhar para o teste de MLPA que é mais econômico ou se a técnica de FISH seria melhor empregada já que mostra a localização cromossômica da alteração.

Portanto todas as técnicas têm suas vantagens e muitas vezes deverão ser utilizadas em conjunto para que o diagnóstico molecular seja concluído.

ANEXO A

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0619/11

Título: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CITOGENÉTICOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS

Pesquisador Responsável: Chong Ae Kim

Pesquisador Executante: Évelin Aline Zanardo

Co-autores: Leslie Domenici Kulikowski

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: PEDIATRIA

A 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, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/09/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 14 de Setembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B

Imagens representativas das sondas utilizadas na técnica de FISH

- *Wolf-Hirschhorn Syndrome Probe* – LPU 009®

- *Cri-Du-Chat and SOTOS Syndrome Probe Combination* – LPU 013®

- *Saethre-Chotzen* and *Williams-Beuren* Syndrome Probe Combination – LPU 024®

- Smith Magenis (FLII) and Miller-Dieker Syndrome Probe Combination – LPU 007®

- DiGeorge/VCFS *TUPLE1* and 22q13.3 Deletion Syndrome Probe Combination – LPU 004®

ANEXO C

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P064 – B2 ou B3 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P064	<i>TNFRSF18</i>	4	1p36.33	1.129.419	1.129.488	03050-L01762	382
P064	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33	1.137.299	1.137.363	02269-L01761	130
P064	<i>SCNN1D</i>	6	1p36.33	1.207.448	1.207.503	06778-L06730	135
P064	<i>GNB1</i>	3	1p36.33	1.746.713	1.746.782	02890-L07968	178
P064	<i>SKI</i>	6	1p36.33	2.227.403	2.227.467	02891-L02359	436
P064	<i>PANK4</i>	2	1p36.32	2.443.029	2.443.092	01122-L00680	247
P064	<i>TP73</i>	1	1p36.32	3.558.490	3.558.547	01682-L02331	336
P064	<i>NSD1</i>	5	5q35.2	176.563.758	176.563.822	02589-L11228	142
P064	<i>NSD1</i>	13	5q35.3	176.611.340	176.611.407	02594-L02065	445
P064	<i>NSD1</i>	18	5q35.3	176.633.315	176.633.382	01303-L00855	211
P064	<i>TWIST1</i>	1	7p21.1	19.122.927	19.122.989	01969-L02364	319
P064	<i>TWISTNB</i>	1	7p21.1	19.715.031	19.715.098	02146-L01642	202
P064	<i>FZD9</i>	1	7q11.23	72.487.583	72.487.650	01330-L00881	256
P064	<i>STX1A</i>	8	7q11.23	72.755.115	72.755.188	01332-L00883	292
P064	<i>ELN</i>	1	7q11.23	73.080.388	73.080.448	01333-L00876	310
P064	<i>LIMK1</i>	5	7q11.23	73.149.370	73.149.442	01337-L02333	391
P064	* <i>CYLN2</i>	3	7q11.23	73.390.805	73.390.863	01561-L01133	229
P064	* <i>CYLN2</i>	13	7q11.23	73.449.357	73.449.415	01339-L00885	418
P064	* <i>CLIP2</i>	3	7q11.23	73.390.805	73.390.863	01561-L01133	229
P064	* <i>CLIP2</i>	14	7q11.23	73.449.357	73.449.415	01339-L00885	418
P064	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2	21.362.818	21.362.879	02020-L01539	172
P064	<i>NDN</i>	1	15q11.2	21.482.490	21.482.551	02024-L01542	220
P064	<i>UBE3A</i>	13	15q11.2	23.136.395	23.136.468	09669-L00864	400
P064	<i>UBE3A</i>	7	15q11.2	23.167.740	23.167.813	04620-L00863	160
P064	<i>GABRB3</i>	3	15q12	24.569.103	24.569.159	02038-L02330	409
P064	<i>HIC1</i>	1	17p13.3	1.905.107	1.905.162	01444-L02367	364
P064	<i>HIC1</i>	3	17p13.3	1.907.548	1.907.600	01435-L00945	184
P064	* <i>METT10D</i>	1	17p13.3	2.361.823	2.361.890	01924-L08393	427
P064	* <i>METTL16</i>	1	17p13.3	2.361.823	2.361.890	01924-L08393	427
P064	<i>PAFAH1B1</i>	5	17p13.3	2.517.119	2.517.192	01443-L08394	238
P064	<i>PAFAH1B1</i>	11	17p13.3	2.531.787	2.531.857	01925-L01477	283

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P064	<i>ASPA</i>	6	17p13.2	3.344.407	3.344.480	01325-L07456	265
P064	<i>TRPV1</i>	19	17p13.2	3.416.899	3.416.969	01472-L00946	148
P064	<i>TNFRSF13B</i>	3	17p11.2	16.792.947	16.793.017	01448-L00932	166
P064	<i>LRRC48</i>	6	17p11.2	17.832.032	17.832.099	01452-L00936	274
P064	<i>LLGL1</i>	4	17p11.2	18.076.721	18.076.791	01453-L00937	301
P064	<i>PRPSAP2</i>	3	17p11.2	18.709.878	18.709.951	01454-L00938	329
P064	<i>MFAP4</i>	6	17p11.2	19.228.439	19.228.506	01455-L00939	355
P064	<i>JAG1</i>	22	20p12.2	10.570.383	10.570.447	01697-L02329	346
P064	<i>JAG1</i>	1	20p12.2	10.602.274	10.602.343	03072-L02472	472
P064	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	17.621.597	17.621.661	05462-L05809	191
P064	<i>CDC45</i>	1	22q11.21	17.847.478	17.847.540	05463-L05808	465
P064	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	17.891.318	17.891.378	01218-L06270	196
P064	<i>ARVCF</i>	3	22q11.21	18.358.151	18.358.215	05465-L06731	154
P064	<i>KLHL22</i>	2	22q11.21	19.173.307	19.173.367	03069-L05815	454
P064	<i>SNAP29</i>	5	22q11.21	19.572.014	19.572.084	01235-L00773	373

ANEXO D

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P036 – E1 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P036	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33	1.137.299	1.137.363	02269-L01761	130
P036	<i>SH3BP5L</i>	5	1q44	247.075.309	247.075.380	02392-L02149	307
P036	<i>ACP1</i>	1	2p25.3	252.450	252.520	02274-L08758	136
P036	<i>CAPN10</i>	3	2q37.3	241.178.951	241.179.022	01742-L01308	313
P036	<i>CHL1</i>	5	3p26.3	344.888	344.961	01721-L01329	142
P036	<i>BDH1</i>	4	3q29	198.757.687	198.757.752	02013-L02052	322
P036	<i>PIGG</i>	7b	4p16.3	504.896	504.969	02005-L02047	151
P036	<i>TRIML2</i>	2	4q35.2	189.262.981	189.263.053	12050-L11446	330
P036	<i>PDCD6</i>	6	5p15.33	367.572	367.640	01723-L01327	158
P036	<i>GNB2L1</i>	6	5q35.3	180.597.753	180.597.825	03319-L02737	337
P036	<i>IRF4</i>	2	6p25.3	338.177	338.242	01724-L02048	166
P036	<i>PSMB1</i>	5	6q27	170.688.255	170.688.327	01746-L01304	346
P036	<i>ADAP1</i>	4	7p22.3	926.130	926.193	02275-L02049	172
P036	<i>VIPR2</i>	3	7q36.3	158.595.271	158.595.340	01747-L01303	355
P036	<i>FBXO25</i>	9	8p23.3	403.076	403.141	02397-L01845	179
P036	<i>ZC3H3</i>	2	8q24.3	144.692.300	144.692.367	01748-L01302	361
P036	<i>DMRT1</i>	2	9p24.3	837.054	837.117	01727-L02050	186
P036	<i>EHMT1</i>	23	9q34.3	139.830.278	139.830.335	08205-L08170	372
P036	<i>DIP2C</i>	4	10p15.3	476.820	476.884	02277-L01768	193
P036	<i>PAOX</i>	3	10q26.3	135.045.088	135.045.154	09142-L09953	379
P036	<i>RIC8A</i>	3	11p15.5	199.935	199.999	03315-L02733	202
P036	<i>NCAPD3</i>	2	11q25	133.595.730	133.595.797	01751-L01299	386
P036	<i>SLC6A12</i>	19	12p13.33	169.603	169.674	02276-L01767	208
P036	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	132.243.516	132.243.586	02687-L02154	395
P036	<i>PSPC1</i>	2	13q11	19.244.550	19.244.620	02399-L01847	219
P036	<i>F7</i>	6	13q34	112.817.975	112.818.043	01753-L01297	402
P036	<i>CCNB1IP1</i>	4	14q11.2	19.863.569	19.863.642	01732-L01318	227
P036	<i>MTA1</i>	8	14q32.33	104.995.681	104.995.746	02778-L02201	411
P036	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2	21.362.818	21.362.879	07291-L08858	235
P036	<i>ALDH1A3</i>	11	15q26.3	99.264.898	99.264.971	01755-L01295	418
P036	<i>POLR3K</i>	1	16p13.3	43.278	43.345	01734-L01316	242

<i>Kit</i>	<i>Gene</i>	<i>Éxon</i>	<i>Posição cromossômica</i>	<i>Início</i>	<i>Fim</i>	<i>Sonda</i>	<i>Comprimento da sonda (pb)</i>
P036	<i>GAS8</i>	6	16q24.3	88.630.416	88.630.484	03201-L02669	426
P036	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3	169.259	169.330	01735-L01315	250
P036	<i>TBCD</i>	18	17q25.3	78.451.828	78.451.896	01757-L01293	434
P036	<i>USP14</i>	7	18p11.32	186.695	186.767	01736-L02051	258
P036	<i>RBFA</i>	4	18q23	75.899.526	75.899.599	01758-L01292	441
P036	<i>CDC34</i>	5	19p13.3	492.438	492.506	01737-L01313	265
P036	<i>CHMP2A</i>	6	19q13.43	63.754.814	63.754.869	09143-L10626	450
P036	<i>SOX12</i>	1	20p13	255.053	255.112	02396-L01844	274
P036	<i>OPRL1</i>	3	20q13.33	62.194.534	62.194.598	02688-L02884	458
P036	<i>RBM11</i>	1	21q11.2	14.510.398	14.510.467	01739-L01311	283
P036	<i>PRMT2</i>	4	21q22.3	46.887.913	46.887.971	02586-L02059	466
P036	<i>BID</i>	4	22q11.21	16.606.684	16.606.759	01740-L01310	289
P036	<i>RABL2B</i>	9	22q13.33	49.553.070	49.553.142	01762-L08761	475
P036	<i>SHOX</i>	4	Xp22.33PAR	521.543	521.613	01148-L01331	298
P036	<i>VAMP7</i>	4	Xq28PAR	154.781.022	154.781.096	01763-L02150	483

ANEXO E

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P070 – B2 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P070	<i>TNFRSF18</i>	4b	1p36.33	1.129.414	1.129.484	02270-L01762	306
P070	<i>SH3BP5L</i>	3	1q44	247.077.648	247.077.710	04084-L03605	132
P070	<i>ACP1</i>	5	2p25.3	267.097	267.173	02709-L02856	315
P070	<i>ATG4B</i>	7	2q37.3	242.247.199	242.247.270	02781-L03168	139
P070	<i>CHL1</i>	3	3p26.3	336.381	336.454	02896-L02363	323
P070	<i>KIAA0226</i>	22	3q29	198.883.877	198.883.950	02690-L02842	145
P070	<i>PIGG</i>	8	4p16.3	505.735	505.807	14440-L16146	329
P070	<i>FRG1</i>	1	4q35.2	191.099.071	191.099.141	02691-L02843	152
P070	<i>CCDC127</i>	3	5p15.33	258.918	258.985	02791-L02233	337
P070	<i>GNB2L1</i>	2	5q35.3	180.601.812	180.601.884	02790-L02232	160
P070	<i>IRF4</i>	3	6p25.3	339.901	339.971	04077-L03462	346
P070	<i>TBP</i>	2	6q27	170.707.891	170.707.964	02694-L02844	166
P070	<i>SUN1</i>	5	7p22.3	844.978	845.042	02780-L02857	355
P070	<i>VIPR2</i>	2	7q36.3	158.627.924	158.627.991	02793-L03167	172
P070	<i>FBXO25</i>	8	8p23.3	398.391	398.466	02715-L00973	362
P070	<i>RECQL4</i>	17	8q24.3	145.708.631	145.708.695	02695-L00610	179
P070	<i>DOCK8</i>	23	9p24.3	376.334	376.404	02716-L00688	370
P070	<i>EHMT1</i>	10	9q34.3	139.776.962	139.777.023	02792-L02846	186
P070	<i>ZMYND11</i>	2a	10p15.3	215.989	216.058	05180-L16343	379
P070	<i>ECHS1</i>	8	10q26.3	135.026.355	135.026.422	02696-L02847	193
P070	<i>BET1L</i>	3b	11p15.5	195.448	195.520	02784-L02226	387
P070	<i>IGSF9B</i>	20	11q25	133.292.680	133.292.754	02697-L02848	202
P070	<i>JARID1A</i>	23	12p13.33	286.991	287.064	02787-L02229	393
P070	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	132.242.375	132.242.452	02686-L02849	211
P070	<i>PSPC1</i>	1	13q11	19.254.548	19.254.619	02717-L03608	402
P070	<i>CDC16</i>	8	13q34	114.027.450	114.027.519	02698-L00753	218
P070	<i>PARP2</i>	16	14q11.2	19.895.643	19.895.709	02718-L00732	409
P070	<i>MTA1</i>	7	14q32.33	104.991.619	104.991.689	02699-L02850	226
P070	<i>NDN</i>	1	15q11.2	21.482.490	21.482.551	04026-L01542	418
P070	<i>TM2D3</i>	3	15q26.3	100.007.800	100.007.870	02701-L02851	233
P070	<i>DECR2</i>	9	16p13.3	402.228	402.289	02720-L00648	427

<i>Kit</i>	<i>Gene</i>	<i>Éxon</i>	<i>Posição cromossômica</i>	<i>Início</i>	<i>Fim</i>	<i>Sonda</i>	<i>Comprimento da sonda (pb)</i>
P070	<i>GAS8</i>	11	16q24.3	88.637.625	88.637.685	02702-L00734	241
P070	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3	183.588	183.659	04081-L03465	436
P070	<i>SECTM1</i>	4	17q25.3	77.874.063	77.874.127	02703-L03169	250
P070	<i>THOC1</i>	21	18p11.32	204.731	204.801	02789-L02231	444
P070	<i>CTDP1</i>	9	18q23	75.575.783	75.575.851	02704-L03607	258
P070	<i>PPAP2C</i>	6	19p13.3	232.437	232.498	03501-L02880	450
P070	<i>CHMP2A</i>	3	19q13.43	63.755.470	63.755.537	02705-L02853	265
P070	<i>ZCCHC3</i>	1	20p13	226.979	227.046	02723-L00641	459
P070	<i>UCKL1</i>	6	20q13.33	62.046.371	62.046.438	02706-L00642	274
P070	<i>HSPA13</i>	2	21q11.2	14.675.469	14.675.536	02724-L00334	466
P070	<i>S100B</i>	2	21q22.3	46.846.658	46.846.729	02587-L02854	281
P070	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	15.959.672	15.959.739	02725-L16344	478
P070	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	49.413.270	49.413.327	02707-L00661	290
P070	<i>SHOX</i>	5	Xp22.33PAR	521.733	521.796	03714-L16345	484
P070	<i>VAMP7</i>	8	Xq28PAR	154.825.695	154.825.768	02708-L02855	298

ANEXO F

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P250 – B1 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P250	<i>SLC25A4</i>	2	4q35.1	186.303.263	186.303.335	12093-L15011	326
P250	<i>KLKB1</i>	3	4q35.2	187.390.325	187.390.398	01217-L00694	184
P250	<i>PPP1R3B</i>	2	8p23.1	9.036.240	9.036.313	01243-L07392	472
P250	<i>MSRA</i>	2	8p23.1	10.102.752	10.102.819	01240-L00787	427
P250	<i>GATA4</i>	7	8p23.1	11.653.542	11.653.609	01226-L03844	274
P250	<i>EHMT1</i>	2	9q34.3	139.731.001	139.731.062	05059-L07380	136
P250	<i>EHMT1</i>	15	9q34.3	139.805.146	139.805.210	05058-L07382	154
P250	<i>GATA3</i>	3	10p15.1	8.140.560	8.140.624	01225-L09140	267
P250	<i>GATA3</i>	6	10p15.1	8.155.803	8.155.870	07636-L07321	301
P250	<i>TCEB1P3</i>	3' UTR	10p14	10.588.971	10.589.047	01232-L17068	350
P250	<i>CUGBP2</i>	5' UTR	10p14	11.017.023	11.017.090	01234-L00781	364
P250	<i>CUGBP2</i>	2	10p14	11.247.526	11.247.596	01522-L00952	382
P250	<i>NEBL</i>	1	10p12.31	21.226.273	21.226.342	08480-L15878	487
P250	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3	169.259	169.330	01735-L07385	255
P250	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3	183.588	183.659	04081-L03465	436
P250	<i>GEMIN4</i>	2	17p13.3	596.607	596.671	01238-L07390	409
P250	<i>YWHAE</i>	4	17p13.3	1.211.255	1.211.325	13603-L03531	391
P250	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	15.959.672	15.959.739	01082-L15012	335
P250	<i>SLC25A18</i>	1	22q11.21	16.423.313	16.423.380	05457-L07613	142
P250	<i>BID</i>	4	22q11.21	16.606.684	16.606.759	01767-L07389	357
P250	<i>MICAL3</i>	20	22q11.21	16.704.655	16.704.719	05458-L04861	178
P250	<i>USP18</i>	1	22q11.21	17.012.924	17.012.985	07528-L04863	226
P250	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	17.621.597	17.621.661	05462-L05809	191
P250	<i>HIRA</i>	1	22q11.21	17.699.015	17.699.079	01214-L02328	160
P250	<i>CDC45L</i>	1	22q11.21	17.847.478	17.847.540	05463-L05808	465
P250	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	17.891.318	17.891.378	01218-L06270	196
P250	<i>GP1BB</i>	2	22q11.21	18.091.521	18.091.580	05464-L10114	208
P250	<i>TBX1</i>	2	22q11.21	18.127.115	18.127.178	05408-L07614	172
P250	<i>TBX1</i>	7	22q11.21	18.133.292	18.133.352	10810-L14347	245
P250	<i>TXNRD2</i>	1	22q11.21	18.266.225	18.266.285	01223-L05814	238
P250	<i>DGCR8</i>	2	22q11.21	18.453.612	18.453.678	08475-L08486	148

<i>Kit</i>	<i>Gene</i>	<i>Éxon</i>	<i>Posição cromossômica</i>	<i>Início</i>	<i>Fim</i>	<i>Sonda</i>	<i>Comprimento da sonda (pb)</i>
P250	<i>ZNF74</i>	Intron 1-2	22q11.21	19.079.428	19.079.495	05927-L07395	202
P250	<i>KLHL22</i>	1	22q11.21	19.173.307	19.173.367	01227-L05815	283
P250	<i>MED15</i>	Intron 8-9	22q11.21	19.266.745	19.266.813	01231-L15877	316
P250	<i>SNAP29</i>	1	22q11.21	19.572.014	19.572.084	01235-L00773	373
P250	<i>LZTR1</i>	2	22q11.21	19.679.191	19.679.261	01521-L00951	418
P250	<i>HIC2</i>	2	22q11.21	20.129.442	20.129.511	13302-L15009	308
P250	<i>PPIL2</i>	20	22q11.21	20.379.687	20.379.748	07529-L04870	130
P250	<i>TOP3B</i>	7	22q11.22	20.652.996	20.653.065	13299-L14649	292
P250	<i>RTDR1</i>	6	22q11.22	21.734.047	21.734.115	08484-L09139	261
P250	<i>GNAZ</i>	3	22q11.22	21.795.392	21.795.456	08478-L17067	215
P250	<i>RTDR1</i>	2	22q11.22	21.812.539	21.812.602	08479-L08490	454
P250	<i>RAB36</i>	1	22q11.22	21.817.561	21.817.617	05932-L04872	342
P250	<i>SMARCB1</i>	1	22q11.23	22.459.370	22.459.434	05928-L07969	220
P250	<i>SMARCB1</i>	9	22q11.23	22.506.362	22.506.429	05933-L05812	400
P250	<i>SNRPD3</i>	2	22q11.23	23.283.701	23.283.765	08481-L08492	166
P250	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	49.413.269	49.413.327	01093-L00661	445
P250	<i>SHANK3</i>	22	22q13.33	49.507.581	49.507.645	06787-L07383	232

ANEXO G

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P356 – A1 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P356	<i>MTHFR</i>	1	1p36.22	11.785.704	11.785.766	04683-L04061	409
P356	<i>SCN5A</i>	24	3p21.3	38.573.727	38.573.797	07816-L07546	373
P356	<i>IL4</i>	1	5q31.1	132.037.612	132.037.671	00797-L00463	130
P356	<i>MYB</i>	15	6q23.3	135.580.713	135.580.779	12530-L15123	499
P356	<i>ETS1</i>	7	11q24.3	127.838.639	127.838.711	09495-L09752	274
P356	<i>RPGRIP1</i>	20	14q11.2	20.872.608	20.872.681	07030-L06641	238
P356	<i>TSHR</i>	5	14q31.1	80.627.166	80.627.241	10973-L11644	184
P356	<i>SPRED1</i>	6	15q14	36.419.281	36.419.353	11018-L11687	346
P356	<i>FLCN</i>	12	17p11.2	17.059.231	17.059.290	08599-L08602	172
P356	<i>CSNK2A1</i>	13	20p13	412.212	412.275	05116-L04971	457
P356	<i>GAB4</i>	10	22q11	15.823.512	15.823.575	13888-L15426	244
P356	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	15.959.672	15.959.739	01082-L00660	337
P356	<i>CECR5</i>	2	22q11.1	16.010.519	16.010.576	06251-L05757	448
P356	<i>CECR1</i>	2	22q11.1	16.068.084	16.068.148	05777-L10758	262
P356	<i>CECR2</i>	1	22q11.2	16.336.641	16.336.704	13953-L15492	391
P356	<i>SLC25A18</i>	1	22q11.21	16.423.313	16.423.380	05457-L05806	137
P356	<i>BCL2L13</i>	4	22q11.21	16.551.763	16.551.833	03193-L02546	202
P356	<i>BID</i>	5	22q11.2	16.602.190	16.602.252	13955-L15524	353
P356	<i>BID</i>	4	22q11.21	16.606.684	16.606.759	01767-L16426	362
P356	<i>MICAL3</i>	20	22q11.21	16.704.655	16.704.719	05458-L04861	178
P356	<i>PEX26</i>	3	22q11.2	16.946.217	16.946.277	13954-L15523	283
P356	<i>USP18</i>	1	22q11.21	17.012.924	17.012.985	07528-L04863	226
P356	<i>PRODH</i>	3	22q11.21	17.298.536	17.298.601	07486-L16427	428
P356	<i>PRODH</i>	1	22q11.21	17.303.979	17.304.040	07485-L07143	152
P356	<i>GSC2</i>	2	22q11.21	17.517.208	17.517.269	05461-L16422	166
P356	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	17.621.597	17.621.661	05462-L05809	191
P356	<i>HIRA</i>	1	22q11.21	17.699.015	17.699.079	01214-L02328	160
P356	<i>CDC45L</i>	1	22q11.21	17.847.478	17.847.540	05463-L05808	465
P356	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	17.891.318	17.891.378	01218-L06270	196
P356	<i>GTSE1</i>	2	22q13.31	45.071.941	45.071.997	06080-L05535	220
P356	<i>GTSE1</i>	7	22q13.31	45.090.647	45.090.709	06097-L06370	418

<i>Kit</i>	<i>Gene</i>	<i>Éxon</i>	<i>Posição cromossômica</i>	<i>Início</i>	<i>Fim</i>	<i>Sonda</i>	<i>Comprimento da sonda (pb)</i>
P356	<i>ALG12</i>	10	22q13.33	48.683.364	48.683.432	06733-L16568	208
P356	<i>MLC1</i>	13	22q13.33	48.840.502	48.840.563	06082-L16424	250
P356	<i>PLXNB2</i>	13	22q13.33	49.063.937	49.063.995	06083-L05538	256
P356	<i>SBF1</i>	4	22q13.33	49.252.922	49.252.975	06084-L16425	268
P356	<i>CPT1B</i>	19	22q13.33	49.354.177	49.354.241	06101-L16428	474
P356	<i>MAPK8IP2</i>	12	22q13.33	49.396.364	49.396.425	05111-L04495	290
P356	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	49.413.269	49.413.327	02707-L14005	297
P356	<i>SHANK3</i>	2	22q13.33	49.461.912	49.461.979	06784-L06376	309
P356	<i>SHANK3</i>	9	22q13.33	49.480.238	49.480.305	06785-L06377	400
P356	<i>SHANK3</i>	16	22q13.33	49.490.265	49.490.327	06786-L16421	143
P356	<i>SHANK3</i>	20	22q13.33	49.507.581	49.507.645	06787-L07383	232
P356	<i>ACR</i>	1	22q13.33	49.523.525	49.523.595	09363-L05557	382
P356	<i>ACR</i>	2	22q13.33	49.524.697	49.524.758	05112-L16429	484
P356	<i>ACR</i>	3	22q13.33	49.525.107	49.525.162	06087-L05542	319
P356	<i>RABL2B</i>	9	22q13.33	49.553.895	49.553.954	06088-L05543	328

ANEXO H

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P029 – A1 da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos – (NCBI36/hg18)

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P029	<i>MSH6</i>	5	2p16.3	47.884.239	47.884.306	01440-L00909	445
P029	<i>VHL</i>	2	3p25.3	10.163.206	10.163.273	01160-L00716	391
P029	<i>CPOX</i>	4	3q12	99.790.262	99.790.329	01112-L00549	157
P029	<i>KLKB1</i>	3	4q35.2	187.390.325	187.390.398	01217-L00694	184
P029	<i>NSD1</i>	5' UTR	5q35.3	176.492.580	176.492.635	01310-L11225	337
P029	<i>PMS2</i>	7	7p22	6.003.490	6.003.554	01181-L00742	265
P029	<i>TWIST1</i>	3	7p21.2	19.122.927	19.122.989	01165-L00721	238
P029	<i>HOXA3</i>	3	7p15	27.116.666	27.116.724	01436-L00907	175
P029	<i>FKBP6</i>	9	7q11.23	72.410.284	72.410.348	01629-L01215	166
P029	<i>FZD9</i>	1	7q11.23	72.487.583	72.487.650	01330-L00881	256
P029	<i>TBL2</i>	2	7q11.23	72.626.283	72.626.350	01331-L00882	274
P029	<i>STX1A</i>	8	7q11.23	72.755.115	72.755.188	01332-L00883	292
P029	<i>ELN</i>	1	7q11.23	73.080.388	73.080.448	01333-L00876	310
P029	<i>ELN</i>	6	7q11.23	73.094.914	73.094.972	01334-L00877	328
P029	<i>ELN</i>	20	7q11.23	73.108.586	73.108.647	01336-L00878	364
P029	<i>ELN</i>	33	7q11.23	73.120.975	73.121.045	01335-L00879	346
P029	<i>LIMK1</i>	5	7q11.23	73.149.370	73.149.442	01337-L00880	382
P029	<i>RFC2</i>	10	7q11.23	73.284.387	73.284.454	01658-L01240	400
P029	<i>CYLN2</i>	3	7q11.23	73.390.805	73.390.863	01561-L01133	229
P029	<i>CYLN2</i>	13	7q11.23	73.449.357	73.449.415	01339-L00885	418
P029	<i>ABCB1</i>	2	7q21.1	87.068.223	87.068.283	01115-L00005	193
P029	<i>CASP2</i>	9	7q35	142.711.002	142.711.054	00680-L00121	427
P029	<i>TPD52</i>	9	8q21.13	81.112.843	81.112.913	01116-L00620	202
P029	<i>ST7</i>	5	8q22.3	105.578.750	105.578.816	01045-L00615	355
P029	<i>PCSK5</i>	15	9q21.3	77.938.853	77.938.920	00968-L00555	373
P029	<i>ANXA7</i>	3	10q22	74.828.036	74.828.106	00971-L09490	301
P029	<i>VCL</i>	21	10q22	75.547.782	75.547.843	01119-L00559	220
P029	<i>MEN1</i>	10	11q13	64.328.444	64.328.508	01164-L00720	247
P029	<i>ASPA</i>	4	17p13.3	3.339.264	3.339.337	01326-L00873	283
P029	<i>NEUROD2</i>	2	17q12	35.013.588	35.013.661	01057-L00630	434
P029	<i>PCQAP</i>	Intron 8-9	22q11.21	19.266.745	19.266.813	01231-L05816	319

ANEXO I

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (continuação)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
01	46,XX	del 17p11.2 (14 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
02	47,XY	del 19p13.12 (39,4 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
03	46,XX	del 22q11.21 (537,4 kb)	del 22q11.21 atípica	nl	nl	del 22q11.21 atípica	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
04	46,XX,add(7)	dup 7q11.23→q22.1 (25,2 Mb)	nl	nl	nl	-	-	inconclusivo p/ crom 7	✓	✓	?
05	46,XX,21ps+	dup 22q11.21 (163,5 kb)	nl	nl	nl	nl	inconclusivo	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
06	46,XY	dup 18q22.2→q22.3 (665,4 kb)	nl	nl	nl	nl	-	-	✓	✓	-
07	46,XX	dup 22q11.21 (130,3 kb)	nl	nl	nl	nl	dup 22q11.21 atípica (PRODH)	inconclusivo p/ crom 22	✓	✓	?
08	46,XY	del 8p22 (125,9 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
09	46,XX	dup Xq22.2 (192,5 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
10	46,XX	del 1q21.1→q21.2 (1,3 Mb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
11	46,XY	dup 12q13.11 (137,6 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
12	46,XX	del 8p23.2 (255,6 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
13	46,XX	del 16p11.2 (394,9 kb)	nl	inconclusivo	nl	-	-	-	✓	✓	-
14	46,XX	del 6q25.2→q27 (11,9 Mb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
15	46,XX	dup 22q13.31 (340,1 kb)	nl	nl	nl	inconclusivo	inconclusivo	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
16	46,XX	dup 22q11.22 (247,5 kb)	nl	nl	nl	inconclusivo	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
17	46,XY	del 22q11.21 (2,6 Mb)	del 22q11.21 típica	nl	nl	del 22q11.21 típica	del 22q11.21 típica	-	✓	✓	-
18	46,XY	dup 7p22.2 (149,6 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
19	46,XY	del 18p11.21 (273,6 kb)	dup 7q11.23 (FZD9) atípica	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
20	46,XY	del 6q24.3→q25.1 (849,6 kb)	nl (+P029 nl)	nl	nl	-	-	nl p/ crom 7	✓	✓	✓
21	46,XX	del 17q23.3 (30 kb) del Xq22.1 (1 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
22	inconclusivo	del 4q34.3→q35.2 (10,8 Mb) dup 5q34→q35.3 (20,6 Mb)	dup 5q35.3 típica	dup 5q35.3; del 4q35.2	dup 5q35.3; del 4q35.2	-	-	-	✓	✓	-

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (continuação)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
23	47,XX,+mar	dup 12q24.32→q24.33 (7,0 Mb) dup 15q11.1→q21.2 (31,8 Mb)	dup 15q11.12 típica	dup 12q24.33; dup 15q11.2-cen	dup 12q24.33; dup 15q11.2-cen	-	-	-	✓	✓	-
24	46,XY,der(9)t(9;18)(p22;q12.2)pat	del 9p24.3→p24.2 (4,2 Mb) dup 18q12.3→q23 (38,9 Mb)	nl	del 9p24.3; dup 18q23	del 9p24.3; dup 18q23	inconclusivo	nl	del 9pter	✓	✓	✓
25	47,XX,+(14)(q22)mat	dup 5p15.33→p13.3 (33,4 Mb) dup 14q11.2→q12 (5,8 Mb)	nl	dup 5p15.33; dup 14q11.2-cen	dup 5p15.33; dup 14q11.2-cen	-	-	-	✓	✓	-
26	46,XX	del 2p11.2 (219,9 kb) dup 8p23.2 (221,1 kb)	nl	nl	nl	nl	-	-	✓	✓	-
27	46,XY	dup 7q36.3 (161,3 kb) dup 11q24.2 (170,0 kb)	nl	dup 7q36.3	inconclusivo	nl	-	-	✓	✓	-
28	46,XX	del 4p16.3→p16.1 (6,4 Mb) dup 16p13.11 (1,1 Mb)	nl	del 4p16.3	del 4p16.3	nl	-	del 4p16.3	✓	✓	✓
29	46,XY	del 16p12.2 (141,1 kb) del Yq11.223 (480,8 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
30	46,XY	del 7q11.23 (1,4 Mb) 4 regiões – LOH	del 7q11.23 típica	nl	nl	-	-	del 7q11.23	✓	✓	✓
31	46,XY	del 3p13→p12.1 (11,5 Mb) del 7p21.1→p15.3 (878,6 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
32	46,XY	del 22q13.2 (598,2 kb) dup 8p22 (102,9 kb)	nl	nl	nl	nl	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
33	46,XY	del 8q24.23 (119,7 kb) dup 12p11.21 (132,1 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
34	46,XX	del 8p23.2→p23.1 (128,3 kb) dup 10q11.21 (139,5 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
35	46,XX	dup Xp22.31→p22.2 (216,3 kb) dup Xp22.2 (556,8 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
36	46,XX	dup 15q26.3 (305,0 kb) 10 regiões – LOH	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
37	46,XX,4qh	del 4q32.1→q35.2 (29,3 Mb) dup 5p15.2 (378,8 kb)	nl	del 4q35.2	del 4q35.2	-	-	-	✓	✓	-

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (continuação)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
38	46,XY	del 2p11.2 (219,9 kb) del Yp11.2 (275,9 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
39	46,XX	del 2q37.3 (3,5 Mb) dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb)	dup 5q35.3 típica	del 2q37.3; dup 5q35.3	del 2q37.3; dup 5q35.3	-	-	-	✓	✓	-
40	46,XX	dup 22q13.31 (344,9 kb) dup 10q11.22 (686,4 kb)	nl	nl	nl	nl	nl	inconclusivo p/ crom 22	✓	✓	?
41	46,XX	dup 22q11.23→q12.1 (199,2 kb) del 9p23→p22.3 (1,1 Mb)	nl	nl	nl	nl	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
42	46,XY,add(7)(p22)	del 7p22.3 (1,7 Mb) dup 12q24.22→q24.33 (17 Mb)	nl	del 7p22.3; dup 12q24.33	del 7p22.3; dup 12q24.33	-	-	-	✓	✓	-
43	45,X,add(5)(p15)	dup 5p15.33 (2,4 Mb) del Yq11.221→q12 (40 Mb)	nl	dup 5p15.33; del Yq12	dup 5p15.33; del Yq12	-	-	-	✓	✓	-
44	46,XY	dup 3q26.31→q29 (23,4 Mb) del 9p24.3→p23 (11,5 Mb)	nl	dup 3q29; del 9p24.3	dup 3q29; del 9p24.3	-	-	-	✓	✓	-
45	46,XY	del 17p13.3 (2,2 Mb) dup 17q25.1→q25.3 (6,6 Mb)	del 17p13.3 atípica	del 17p13.3; dup 17q25.3	del 17p13.3; dup 17q25.3	-	-	-	✓	✓	-
46	46,XX	del 2q33.1 (20 kb) del 3q28 (4 kb) 1 região – LOH	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
47	46,XX	del 1q25.3 (93,2 kb) dup 3q22.1 (219,8 kb) del 9p21.1 (52,9 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
48	46,XY	dup 9p11.2 (2,5 Mb) del 9p11.2 (96,4 kb) dup 9p11.2 (858,3 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
49	46,XX	del 1p36.33→p36.32 (1,9 Mb) del 1p36.32 (973,6 kb) dup 1p36.32 (167,0 kb)	del 1p36 atípica	del 1p36.33	del 1p36.33	-	-	-	✓	✓	-

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (continuação)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
50	46,XY,inv(9)(qh)	del 8q24.23 (119,7 kb) del Yq11.21 (158,2 kb) dup Xp22.33 (898,2 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
51	46,XX	del 8q24.23 (119,7 kb) dup 14q11.2 (211,1 kb) 8 regiões – LOH	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
52	46,XX	dup 4q28.3 (362,0 kb) del 22q11.23→q12.1 (178,2 kb) dup Xq22.2 (124,8 kb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
53	46,XX	del Xp22.13→p22.12 (1,5 Mb) del 19q13.41 (91,9 kb) dup 15q11.2 (1,4 Mb)	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
54	46,XY	dup 14q32.33 (999,3 kb) dup 7q11.23 (554,8 kb) del 5q12.1 (313,4 kb)	nl	nl	nl	-	-	nl p/ crom 7	✓	✓	✓
55	46,XY	del 4q35.1→q35.2 (5,1 Mb) dup Xq27.1→q28 (15,4 Mb) del 2p11.2 (219,9 kb)	nl	del 4q35.2; dup Xq28	del 4q35.2; dup Xq28	-	-	-	✓	✓	-
56	inconclusivo	dup 9p24→p23 (13,0 Mb) del 15q11.2 (132,2 kb) del 18q22→q23 (7,3 Mb) dup Xp22.31 (286,7 kb)	nl	dup 9p24.3; del 18q23	dup 9p24.3; del 18q23	nl	nl	dup 9pter	✓	✓	✓
57	46,XX	del 2q37.3 (3,5 Mb) dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb) del 12p13.31 (136,7 kb) dup 18q12.1 (241,6 kb)	dup 5q35.3 típica	del 2q37.3; dup 5q35.3	del 2q37.3; dup 5q35.3	-	-	-	✓	✓	-
58	46,XY	del 4p16.3→p16.1 (9,3 Mb) dup 8p23.3→p23.1 (6,8 Mb) dup 12p13.31 (155,9 kb) dup 12p11.21 (169,2 kb)	nl	del 4p16.3; dup 8p23.3	del 4p16.3; dup 8p23.3	-	-	-	✓	✓	-

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (continuação)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
59	46,XX,der(7),t(4;7)(?q;?q)	dup 4q26→q35.2 (72,1 Mb) dup 6q27 (269,9 kb) del 7p21.2 (301,6 kb) del 7q36.3 (620,5 kb)	nl	dup 4q35.2; del 7q36.3	dup 4q35.2; del 7q36.3	-	-	-	✓	✓	-
60	46,XY,add(6)	dup 6p22.3→p12.3 (26,0 Mb) dup Xp22.33 (2,0 Mb) del 2p11.2 (219,9 kb) dup 2q22.2→q22.3 (1,6 Mb) dup 10q11.22 (787,9 kb)	nl	inconclusivo	nl	-	-	-	✓	✓	-
61	46,XX	dup 2p25.3→p24.3 (14,8 Mb) del 4q35.1→q35.2 (4,4 Mb) del 15q11.1→q11.2 (1,9 Mb) dup 22q11.23→q12.1 (244,9 kb) dup 6q27 (260,2 kb)	nl	inconclusivo	dup 2p25.3; del 4q35.2	del 4q35 (KLKB1)	-	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
62	47,XXX	del 7q11.23 (115 kb) del 7q11.23 (1,2 Mb) del 7q11.23 (350 kb) dup Xp22.33 (2,5 Mb) dup Yp11.31→q11.23 (25 Mb) dup 7p14.3 (60 kb) del 13q31.3 (58 kb)	del 7q11.23 (+P029) atípica	dup Yp11.32; dup Yq12	dup Yp11.32; dup Yq12	-	-	-	✓	✓	-
63	46,XX	dup 16q24.1→q24.3 (4,3 Mb) dup 14q11.2 (211,1 kb) del 16p13.3 (91,2 kb) dup 22q11.22 (247,3 kb) dup 1p32.3 (169,6 kb) del 16p13.3 (613,1 kb) dup Xq22.2 (130,9 kb)	nl	inconclusivo	del 16p13.3; dup 16q24.3	inconclusivo	nl	-	✓	✓	-

Quadro 7 – Resultados da comparação das técnicas citogenômicas: FISH, MLPA e *array* (final)

REGISTRO	Cariótipo	Array	MLPA					FISH	RESULTADO FINAL		
		ALTERAÇÃO / TAMANHO	P064	P036	P070	P250	P356				
64	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	nl p/ crom 5	✓	✓	✓
65	46,XY	Sem alteração	nl	inconclusivo	nl	-	-	nl p/ crom 5	✓	✓	✓
66	46,XY	Sem alteração	inconclusivo	inconclusivo	nl	-	-	nl p/ crom 17	✓	✓	✓
67	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
68	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
69	46,XX	Sem alteração	nl	del 16p13.3	del 19p13.3	-	-	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
70	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
71	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
72	46,XX	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
73	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
74	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
75	46,XX	Sem alteração	nl	nl	nl	nl	nl	-	✓	✓	-
76	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	-	-	-	✓	✓	-
77	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	nl	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓
78	46,XY	Sem alteração	nl	nl	nl	nl	nl	nl p/ crom 22	✓	✓	✓

ANEXO J

Quadro 8 – Resultados da técnica de *array*, com as plataformas utilizadas, classificação e tamanho das alterações e os pontos de quebra (continuação)

REGISTRO	Array			
	PLATAFORMA	CLASSIFIC.	ALTERAÇÃO / TAMANHO	START / END
01	Affymetrix HD	Patogênica	del 17p11.2 (14 kb)	17,622,000 - 17,638,500
02	Affymetrix 6.0	Benigna	del 19p13.12 (39,4 kb)	14,729,069 - 14,768,462
03	Affymetrix 6.0	VOUS	del 22q11.21 (537,4 kb)	21,034,808 - 21,572,202
04	Agilent 105K	Patogênica	dup 7q11.23→q22.1 (25,2 Mb)	74,480,670 - 99,700,362
05	Illumina	Benigna	dup 22q11.21 (163,5 kb)	18,844,632 - 19,008,108
06	Illumina	VOUS	dup 18q22.2→q22.3 (665,4 kb)	68,090,674 - 68,756,043
07	Illumina	Benigna	dup 22q11.21 (130,3 kb)	18,877,787 - 19,008,108
08	Illumina	VOUS	del 8p22 (125,9 kb)	16,399,163 - 16,525,028
09	Illumina	VOUS	dup Xq22.2 (192,5 kb)	103,111,457 - 103,303,968
10	Illumina	Patogênica	del 1q21.1→q21.2 (1,3 Mb)	146,512,899 - 147,826,658
11	Illumina	Benigna	dup 12q13.11 (137,6 kb)	47,608,167 - 47,745,802
12	Illumina	Benigna	del 8p23.2 (255,6 kb)	4,815,661 - 5,071,270
13	Illumina	VOUS	del 16p11.2 (394,9 kb)	32,257,633 - 32,652,546
14	Illumina	Patogênica	del 6q25.2→q27 (11,9 Mb)	153,258,023 - 165,115,007
15	Illumina	Benigna	dup 22q13.31 (340,1 kb)	47,335,208 - 47,675,283
16	Illumina	Benigna	dup 22q11.22 (247,5 kb)	22,314,463 - 22,561,973
17	Illumina	Patogênica	del 22q11.21 (2,6 Mb)	18,877,787 - 21,462,353
18	Illumina	Benigna	dup 7p22.2 (149,6 kb)	4,024,024 - 4,173,613
19	Illumina	Benigna	del 18p11.21 (273,6 kb)	14,550,022 - 14,823,578
20	Illumina	VOUS	del 6q24.3→q25.1 (849,6 kb)	148,971,363 - 149,820,948
21	Affymetrix HD	Benigna	del 17q23.3 (30 kb) del Xq22.1 (1 kb)	61,947,000 - 61,977,500 99,904,100 - 99,905,800
22	Agilent 180K	Patogênica	del 4q34.3→q35.2 (10,8 Mb) dup 5q34→q35.3 (20,6 Mb)	179,962,284 - 190,790,881 160,148,716 - 180,712,253
23	Agilent 180K	Patogênica	dup 12q24.32→q24.33 (7,0 Mb) dup 15q11.1→q21.2 (31,8 Mb)	126,850,508 - 133,819,092 20,375,156 - 52,129,171
24	Agilent 180K	Patogênica	del 9p24.3→p24.2 (4,2 Mb) dup 18q12.3→q23 (38,9 Mb)	199,953 - 4,366,197 39,129,720 - 78,012,829
25	Agilent 180K	Patogênica	dup 5p15.33→p13.3 (33,4 Mb) dup 14q11.2→q12 (5,8 Mb)	37,692 - 33,434,546 19,361,358 - 25,127,451
26	Illumina	Benigna	del 2p11.2 (219,9 kb) dup 8p23.2 (221,1 kb)	90,027,810 - 90,247,720 2,360,883 - 2,581,969
27	Illumina	VOUS	dup 7q36.3 (161,3 kb) dup 11q24.2 (170,0 kb)	158,752,863 - 158,914,170 126,501,321 - 126,671,287
28	Illumina	Patogênica	del 4p16.3→p16.1 (6,4 Mb) dup 16p13.11 (1,1 Mb)	48,283 - 6,471,246 15,126,890 - 16,229,207
29	Illumina	Patogênica VOUS	del 16p12.2 (141,1 kb) del Yq11.223 (480,8 kb)	21,599,125 - 21,740,231 24,392,881 - 24,873,665
30	Illumina	Patogênica LOH	del 7q11.23 (1,4 Mb) 4 regiões – LOH	72,722,981 - 74,138,121 -
31	Illumina	Patogênica VOUS	del 3p13→p12.1 (11,5 Mb) del 7p21.1→p15.3 (878,6 kb)	74,143,047 - 85,618,308 20,703,948 - 21,582,516
32	Illumina	Patogênica Benigna	del 22q13.2 (598,2 kb) dup 8p22 (102,9 kb)	41,042,091 - 41,640,297 13,847,960 - 13,950,829

Quadro 8 – Resultados da técnica de *array*, com as plataformas utilizadas, classificação e tamanho das alterações e os pontos de quebra (continuação)

REGISTRO	Array			
	PLATAFORMA	CLASSIFIC.	ALTERAÇÃO / TAMANHO	START / END
33	Illumina	Benigna	del 8q24.23 (119,7 kb) dup 12p11.21 (132,1 kb)	137,730,280 - 137,850,011 31,269,300 - 31,401,378
34	Illumina	Benigna	del 8p23.2→p23.1 (128,3 kb) dup 10q11.21 (139,5 kb)	6,119,926 - 6,248,244 45,212,898 - 45,352,419
35	Illumina	Benigna	dup Xp22.31→p22.2 (216,3 kb) dup Xp22.2 (556,8 kb)	9,341,848 - 9,558,115 11,059,287 - 11,616,086
36	Illumina	VOUS	dup 15q26.3 (305,0 kb)	100,293,750 - 100,598,777
		LOH	10 regiões – LOH	-
37	Illumina	Patogênica	del 4q32.1→q35.2 (29,3 Mb) dup 5p15.2 (378,8 kb)	161,623,467 - 190,880,409 13,798,819 - 14,177,667
38	Illumina	Benigna	del 2p11.2 (219,9 kb) del Yp11.2 (275,9 kb)	90,027,810 - 90,247,720 9,645,003 - 9,920,943
39	Illumina	Patogênica	del 2q37.3 (3,5 Mb) dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb)	239,550,182 - 243,029,573 172,194,873 - 180,705,539
40	Illumina	Benigna	dup 22q13.31 (344,9 kb)	47,330,328 - 47,675,283
		VOUS	dup 10q11.22 (686,4 kb)	47,073,657 - 47,760,066
41	Illumina	Benigna	dup 22q11.23→q12.1 (199,2 kb)	25,711,667 - 25,910,879
		VOUS	del 9p23→p22.3 (1,1 Mb)	13,468,616 - 14,566,406
42	Agilent 180K	Patogênica	del 7p22.3 (1,7 Mb) dup 12q24.22→q24.33 (17 Mb)	45,130 - 1,691,646 116,878,379 - 133,819,092
43	Agilent 180K	Patogênica	dup 5p15.33 (2,4 Mb) del Yq11.221→q12 (40 Mb)	71,904 - 2,425,306 19,571,776 - 59,311,250
44	Agilent 180K	Patogênica	dup 3q26.31→q29 (23,4 Mb) del 9p24.3→p23 (11,5 Mb)	174,466,591 - 197,845,254 204,104 - 11,659,355
45	Agilent 105K	Patogênica	del 17p13.3 (2,2 Mb) dup 17q25.1→q25.3 (6,6 Mb)	148,092 - 2,310,571 74,307,023 - 80,943,189
46	Affymetrix HD	Benigna	del 2q33.1 (20 kb) del 3q28 (4 kb)	203,291,000 - 203,312,000 189,360,000 - 189,364,000
		LOH	1 região – LOH	-
47	Affymetrix 6.0	VOUS	del 1q25.3 (93,2 kb) dup 3q22.1 (219,8 kb) del 9p21.1 (52,9 kb)	180,300,936 - 180,394,157 129,676,581 - 129,896,364 32,562,410 - 32,615,311
48	Affymetrix 6.0	Patogênica	dup 9p11.2 (2,5 Mb)	41,692,304 - 44,244,868
		Benigna	del 9p11.2 (96,4 kb)	44,727,846 - 44,824,251
		VOUS	dup 9p11.2 (858,3 kb)	44,864,687 - 45,723,022
49	Affymetrix 6.0	Patogênica	del 1p36.33→p36.32 (1,9 Mb) del 1p36.32 (973,6 kb) dup 1p36.32 (167,0 kb)	564,620 - 2,456,203 2,473,257 - 3,446,813 3,474,630 - 3,641,681
50	Illumina	Benigna	del 8q24.23 (119,7 kb) del Yq11.21 (158,2 kb)	137,730,280 - 137,850,011 14,136,291 - 14,294,504
		VOUS	dup Xp22.33 (898,2 kb)	1,635,520 - 2,533,704
51	Illumina	Benigna	del 8q24.23 (119,7 kb) dup 14q11.2 (211,1 kb)	137,730,280 - 137,850,011 20,213,937 - 20,425,051
		LOH	8 regiões – LOH	-

Quadro 8 – Resultados da técnica de *array*, com as plataformas utilizadas, classificação e tamanho das alterações e os pontos de quebra (continuação)

REGISTRO	Array				
	PLATAFORMA	CLASSIFIC.	ALTERAÇÃO / TAMANHO	START / END	
52	Illumina	Benigna	dup 4q28.3 (362,0 kb) del 22q11.23→q12.1 (178,2 kb)	131,880,992 - 132,242,986 25,732,697 - 25,910,879	
		VOUS	dup Xq22.2 (124,8 kb)	103,179,170 - 103,303,968	
53	Illumina	Patogênica	del Xp22.13→p22.12 (1,5 Mb)	18,179,714 - 19,719,264	
		Benigna	del 19q13.41 (91,9 kb)	53,078,641 - 53,170,558	
		VOUS	dup 15q11.2 (1,4 Mb)	21,165,558 - 22,562,318	
54	Illumina	Patogênica	dup 14q32.33 (999,3 kb)	105,998,544 -106,997,898	
		Benigna	dup 7q11.23 (554,8 kb)	76,060,510 - 76,615,349	
		VOUS	del 5q12.1 (313,4 kb)	59,209,183 - 59,522,613	
55	Illumina	Patogênica	del 4q35.1→q35.2 (5,1 Mb) dup Xq27.1→q28 (15,4 Mb)	185,821,036 - 190,880,409 139,513,770 - 154,929,412	
		Benigna	del 2p11.2 (219,9 kb)	90,027,810 - 90,247,720	
56	Illumina	Patogênica	dup 9p24→p23 (13,0 Mb) del 15q11.2 (132,2 kb) del 18q22→q23 (7,3 Mb)	46,587 - 13,044,407 24,352,956 - 24,485,160 70,661,919 - 78,014,582	
			Benigna	dup Xp22.31 (286,7 kb)	7,828,792 - 8,115,453
57	Illumina	Patogênica	del 2q37.3 (3,5 Mb) dup 5q35.1→q35.3 (8,5 Mb)	239,550,182 - 243,029,573 172,179,584 - 180,705,539	
			Benigna	del 12p13.31 (136,7 kb) dup 18q12.1 (241,6 kb)	7,986,563 - 8,123,306 27,815,609 - 28,057,171
58	Illumina	Patogênica	del 4p16.3→p16.1 (9,3 Mb) dup 8p23.3→p23.1 (6,8 Mb)	48,283 - 9,370,908 176,818 - 6,974,050	
			VOUS	dup 12p13.31 (155,9 kb) dup 12p11.21 (169,2 kb)	8,023,943 - 8,179,891 31,240,334 - 31,409,579
59	Illumina	Patogênica	dup 4q26→q35.2 (72,1 Mb) dup 6q27 (269,9 kb)	118,756,418 - 190,880,409 168,329,404 - 168,599,333	
			VOUS	del 7p21.2 (301,6 kb) del 7q36.3 (620,5 kb)	14,436,385 - 14,737,999 158,498,994 - 159,119,486
60	Illumina	Patogênica	dup 6p22.3→p12.3 (26,0 Mb) dup Xp22.33 (2,0 Mb)	24,247,896 - 50,221,081 662,679 - 2,689,575	
			Benigna	del 2p11.2 (219,9 kb)	90,027,810 - 90,247,720
		VOUS	dup 2q22.2→q22.3 (1,6 Mb) dup 10q11.22 (787,9 kb)	143,387,612 - 144,967,929 46,972,140 - 47,760,066	
61	Illumina	Patogênica	dup 2p25.3→p24.3 (14,8 Mb) del 4q35.1→q35.2 (4,4 Mb) del 15q11.1→q11.2 (1,9 Mb)	72,184 - 14,856,914 186,469,493 - 190,880,409 20,482,360 - 22,421,358	
			Benigna	dup 22q11.23→q12.1 (244,9 kb)	25,665,985 - 25,910,879
			VOUS	dup 6q27 (260,2 kb)	168,336,052 - 168,596,251
62	Affymetrix HD	Patogênica	del 7q11.23 (115 kb) del 7q11.23 (1,2 Mb) del 7q11.23 (330 kb) dup Xp22.33 (2,5 Mb) dup Yp11.31→q11.23 (25 Mb)	72,569,012 - 72,685,658 73,082,174 - 74,267,872 74,298,092 - 74,601,104 192,991 - 2,693,037 INTEIRO	
			Benigna	dup 7p14.3 (60 kb) del 13q31.3 (58 kb)	33,134,410 - 33,169,152 94,415,000 - 94,470,000

Quadro 8 – Resultados da técnica de *array*, com as plataformas utilizadas, classificação e tamanho das alterações e os pontos de quebra (continuação)

REGISTRO	Array			
	PLATAFORMA	CLASSIFIC.	ALTERAÇÃO / TAMANHO	START / END
63	Illumina	Patogênica	dup 16q24.1→q24.3 (4,3 Mb)	85,817,324 - 90,148,796
		Benigna	dup 14q11.2 (211,1 kb)	20,213,937 - 20,425,051
			del 16p13.3 (91,2 kb)	105,320 - 196,497
			dup 22q11.22 (247,3 kb)	22,302,762 - 22,550,078
		VOUS	dup 1p32.3 (169,6 kb)	55,103,945 - 55,273,580
			del 16p13.3 (613,1 kb)	215,379 - 828,466
			dup Xq22.2 (130,9 kb)	103,173,049 - 103,303,968
64	Illumina	-	Sem alteração	-
65	Illumina	-	Sem alteração	-
66	Illumina	-	Sem alteração	-
67	Illumina	-	Sem alteração	-
68	Illumina	-	Sem alteração	-
69	Illumina	-	Sem alteração	-
70	Illumina	-	Sem alteração	-
71	Illumina	-	Sem alteração	-
72	Illumina	-	Sem alteração	-
73	Illumina	-	Sem alteração	-
74	Illumina	-	Sem alteração	-
75	Illumina	-	Sem alteração	-
76	Illumina	-	Sem alteração	-
77	Agilent 180K	-	Sem alteração	-
78	Agilent 180K	-	Sem alteração	-

ANEXO K

Figura 10 – Fluxograma do direcionamento de realização dos testes citogenômicos

NOTA: ¹MC/ADNPM: malformação congênita e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; ²MLPA kits combinados: P064/P036/P070;

³Conclusivo: a alteração explica o fenótipo; ⁴Inconclusivo: a alteração não explica o fenótipo.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet*. 2007;5:8-9.

Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet*. 2011;12:363-76.

Bi W, Borgan C, Pursley AN, Hixson P, Shaw CA, Bacino CA, Lalani SR, Patel A, Stankiewicz P, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW. Comparison of chromosomal analysis and chromosomal microarray analysis: what is the value of chromosome analysis in today's genomic array era? *Genet Med*. 2013;15:450-7.

Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Delatycki M, Gardner RJM, Hunter M, James PA, Kannu P, McGillivray G, Pachter N, Peters H, Rieubland C, Savarirayan R, Scheffer IE, Sheffield L, Tan T, White SM, Yeung A, Bowman Z, Ngo C, Choy KW, Cacheux V, Wong L, Amor DJ, Slater HR. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet*. 2009;46:123-31.

Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF, Cross NCP. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer*. 2004;91:1155-9.

Cho EH, Park BYN, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med*. 2009;29:71-6.

Connolly JJ, Glessner JT, Almoguera B, Crosslin DR, Jarvik GP, Sleiman PM, Hakonarson H. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Front Genet*. 2014;5(51):1-8.

De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet.* 2003;40:385-98.

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 da Universidade de São Paulo; 2014.

Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res.* 1995;348:153-62.

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.

Emanuel BS, Saitta SC. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet.* 2007;8:869-83.

Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM. Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med.* 2001;3:416-21.

Fan YS, Ouyang X, Peng J, Sacharow S, Tekin M, Barbouth B, Bodamer O, Yusupov R, Navarrete C, Heller AH, Pena SDJ. Frequent detection of parental consanguinity in children with developmental disorders by a combined CGH and SNP microarray. *Mol Cytogenet.* 2013;6(38):1-6.

Feenstra I, Brunner HG, van Ravenswaaij CM. Cytogenetic genotype-phenotype studies: improving genotyping, phenotyping and data storage. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115:231-9.

Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2005;68:373-8.

Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet.* 2006;15:R57-66.

Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P. "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital J Pediatr.* 2010;36(17):1-8.

Gijsbers ACJ, Lew JYK, Bosch CAJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CAL. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test array first. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1394-402.

González JR, Carrasco JL, Armengol L, Villatoro S, Jover L, Yasui Y, Estivill X. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BMC Bioinformatics.* 2008;9(261):1-15.

Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-knol HE, Kerstjens-frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH, Leegte LK, Kok K, Sinke RJ, van Ravenswaaij-Arts CMA. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostic. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:161-5.

Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. 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;52:161-9.

Jehee FS, Takamori Jt, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, Kim CA, Passos-Bueno MR. 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;54:e425-32.

Jennings LJ, Yu M, Fitzpatrick C, Smith FA. Validation of multiplex ligation-dependent probe amplification for confirmation of array comparative genomic hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 2011;20:166-74.

Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

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;50:33-42.

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merkx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CMA, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BBA, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 2004;41:892-9.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BBA. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009;30:283-92.

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

Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen AJB, Tanke HJ, Breuning MH, Szuhai K. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:610-4.

Kulikowski LD. *Citogenômica aplicada à prática médica*. São Paulo: Atheneu; 2013.

Lam ACF, Lam STS, Lai KKS, Tong TMF, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem.* 2006;39:196-202.

Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 2007;39:S48-54.

Maluf SW, Riegel M. *Citogenética humana*. Porto Alegre: Artmed; 2011.

Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke S. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr.* 2009;76:1027-31.

Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010;12:742-5.

Marenne G, Rodríguez-Santiago B, Closas MG, Pérez-Jurado L, Rothman N, Rico D, Pita G, Pisano DG, Kogevinas M, Silverman DT, Valencia A, Real FX, Chanock SJ, Génin E, Malats N. Assessment of copy number variation using the Illumina Infinium 1M SNP-array: a comparison of methodological approaches in the spanish bladder cancer/EPICURO study. *Hum Mutat.* 2011;32:240-8.

Mefford HC. Genotype to phenotype—discovery and characterization of novel genomic disorders in a “genotype-first” era. *Genet Med.* 2009;11:836-42.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman Ar, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:749-64.

Moorhead OS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613-6.

van Ommen GJB, Breuning MH, Raap AK. FISH in genome research and molecular diagnostics. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5:304-8.

Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, Martínez Bermejo A, Fernández L, López Pajares I. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet.* 2006;69:228-33.

Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969;64:600-4.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:2934-8.

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(7):1-6.

Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev*. 1993;7:127-34.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006;140A:2063-74.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444:444-54

Rooms L, Vandeweyer G, Reyniers E, van Mol K, de Canck I, Van der Aa N, Rossau R, Kooy RF. Array-based MLPA to detect recurrent copy number variations in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:343-8.

Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos ACV, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet*. 2006;43:180-6.

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

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):1-13.

Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat.* 2004;23:413-9.

Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AOH. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem.* 2008;80:9363-8.

Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update.* 2004;10:221-6.

Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115:303-9.

Shen Y, Wu BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics.* 2009; 36:257-65.

Siggberg L, Sirpa Am, Tarja L, Kristiina A, Ilari S, Kati K, Päivi L, Marja H, Liisa M, Esa K, Maarit L, Janna S, Sakari K. High-resolution SNP array analysis of patients with developmental disorder and normal array CGH results. *BMC Med Genet.* 2012;13(84):1-10.

Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet.* 2008;124(1):1-17.

Song HG, Choi SO, Kang IB. Detection of chromosome aberrations in interphase nuclei using fluorescence in situ hybridization technique. *J Korean Med Sci.* 1993;8:257-61.

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

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

Tsuchiya KD. Fluorescence in situ hybridization. *Clin Lab Med.* 2011;31:525-42.

Vallespín E, Palomares Bralo M, Mori MÁ, Martín R, García-Miñaúr S, Fernández L, de Torres ML, García-Santiago F, Mansilla E, Santos F, M-Montañó VE, Crespo MC, Martín S, Martínez-Glez V, Delicado A, Lapunzina P, Nevado J. Customized high resolution CGH-array for clinical diagnosis reveals additional genomic imbalances in previous well-defined pathological samples. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1950-60.

Vasconcelos B, Albano LMJ, Bertola DR, Sbruzzi I, Honjo RS, Moreira M, Brasil AS, Castro C, Koifmann C, Kim CA. Anormalidades cromossômicas nos pacientes atendidos em serviço de genética. *Pediatrics (São Paulo)*. 2007;29:26-32.

Vermeesch JR, Thoelen R, Fryns JP. A familial complex chromosome translocation resulting in duplication of 6p25. *Ann Genet*. 2004;47:275-80.

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij Conny, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:1105-14.

Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat*. 2012;33:906-15.

Villamón E, Piqueras M, Mackintosh C, Alonso J, de Álava E, Navarro S, Noguera R. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch*. 2008;453:47-55.

Visser LELM, de Vries BBA, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47:289-97.

Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat*. 2006;27:814-21.

Winchester L, Yau C, Ragoussis J. Comparing CNV detection methods for SNP arrays. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2009;8:353-66.