Alexandre Torchio Dias

**Investigação citogenômica tecidual *post-mortem* em
portadores de malformações congênitas**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski
Coorientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2015

Alexandre Torchio Dias

**Investigação citogenômica tecidual *post-mortem* em
portadores de malformações congênitas**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski
Coorientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, Alexandre Torchio

Investigação citogenômica tecidual *post-mortem* em portadores de
malformações congênitas / Alexandre Torchio Dias. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Coorientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Anormalidades congênitas 2.Mortalidade infantil
3.Patologia molecular 4.Reação em cadeia da polimerase multiplex
5.Variações do número de cópias de DNA

USP/FM/DBD-300/15

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho a todos os pacientes
que buscam na ciência a explicação
para suas aflições!***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por permitir que durante minha caminhada na realização deste trabalho encontrasse pessoas iluminadas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha jornada!

À minha querida esposa **Li** e meu amado filho **Fael**, pelo apoio, carinho, compreensão durante estes anos de estudo. Agradeço pelo incentivo de sempre e pelos conselhos dados nos momentos de dificuldades. Vocês são fundamentais na minha vida! Amo vocês!

Aos meus queridos pais **André** e **Nadia**, exemplos de força, perseverança, dedicação e garra. Vocês foram os alicerces da construção da minha vida e serei eternamente grato a vocês por tudo!

Aos meus irmãos **Alessandra** e **André**, minha cunhada **Renata** e meus sobrinhos **Biel** e **Gu**, pelo apoio e carinho de sempre!

À minha tia **Maria**, meus sogros **Sérgio** e **Mariza**, minha cunhada **Aline** e a todos os meus familiares que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

À minha querida amiga e orientadora, **Profa. Dra. Leslie Domenici kulikowski**, que depositou confiança em mim, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal. Efetivamente você tem o “*dom*” de inspirar a todos que estão ao seu redor! Obrigado por sempre buscar o “meu melhor” e por ter acreditado no meu potencial! Sou eternamente grato a você!

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Chong Ae Kim**, pelo apoio e sugestões no meu trabalho.

À “**Velha Guarda**” do Laboratório de Citogenômica, meus queridos amigos **Évelin**, **Roberta**, **Gil**, **Marília**, **Flavia**, **Amom**, **Thais**... pessoas fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional! Aprendi bastante durante estes 4 anos de convivência com vocês... Muitas risadas, perrengues e

árduas vitórias juntos...“*Vocês são ótimos*”! Aos “**Jovens**” do nosso grupo: **Fabírcia, Andreza, Julian e Duda**, meu muito obrigado pela amizade, ajuda e comprometimento de sempre!

À minha querida amiga **Cintia**, pelo carinho, amizade e parceria, desde o começo da minha caminhada profissional até a concretização deste trabalho!

À minha querida amiga e irmã **Rosangela Ap. de Lima**, sem seu auxílio não poderia ter realizado este projeto, pelas horas de conversa e de psicologia aplicada!

À minha querida amiga e irmã **Adriana Bortolai**, minha madrinha e mentora na Genética, meu muito obrigado por tudo!

Ao **Fábio Augusto Souto Lopes de Souza**, meu ex-aluno e colega de profissão, agradeço pela ajuda e dedicação para a concretização deste trabalho.

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

À **Profa. Dra. Regina Schultz**, médica do Serviço de Autópsias do HC-FMUSP, que sempre acreditou no nosso trabalho e colaborou extensivamente para sua concretização.

À **Profa. Dra. Cintia Fridman Rave**, à **Dra. Fernanda Toledo** e aos **alunos** do Departamento de Medicina Legal da FMUSP, pelo auxílio na realização dos experimentos com Microssatélites, pelas orientações e principalmente pela amizade!

À **Profa. Dra. Thais Mauad**, pela confiança no nosso trabalho e pela autorização na utilização de amostras da Divisão de Autópsias do HC-FMUSP.

Ao **Prof. Dr. Raymundo Azevedo**, pela confiança depositada no nosso projeto.

À amiga **Dra. Ísida Souza**, pela colaboração na realização das FISHs em cortes histológicos.

Às queridas **Zilá, Rosangela** e aos **residentes** do Departamento de Patologia pelo auxílio e pela realização da coleta das amostras e pelo apoio de sempre.

Aos **residentes** e **médicos** do Serviço de Genética, pela amizade e conhecimentos compartilhados.

À **Dra. Débora Bertola, Guilherme Yamamoto** e **Larissa Testai**, pelo auxílio na realização do teste molecular para Displasia Tanatofórica.

À **Profa. Dra. Monica Lipay**, pela amizade e pelo auxílio na realização das extrações iniciais de amostras parafinadas.

Aos **funcionários** do Departamento de Patologia, **Thiago, Vera** e **Welluma**, que colaboraram de forma direta com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do **Hospital Geral Jesus Teixeira da Costa – Guaianases**, pela colaboração, amizade e apoio durante este período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

***“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais retorna ao seu tamanho original”***

Albert Einstein

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

Sumário

LISTAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE FLUXOGRAMAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1. Malformações congênitas.....	30
2.2. Alterações no DNA associadas às malformações congênitas.....	32
2.2.1. Mosaicismo associado às malformações congênitas.....	34
2.2.1.1. Mosaicismo intratecidual e mosaicismo tecido-específico.....	35
2.3. Análise Genômica de tecidos <i>post-mortem</i>	36
2.3.1. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA).....	37
2.3.2. Análise de Marcadores Microssatélite (MMS) - <i>Short Tandem Repeats</i> (STRs) por sequenciamento de DNA.....	38
2.3.3. <i>Fluorescence in Situ Hybridization</i> (FISH).....	38
2.3.4. Triagem Genômica Completa por <i>Array</i>	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	43
4.1. Casuística.....	44
4.2. Metodologia.....	45
4.2.1. Coleta dos tecidos e conservação.....	45
4.2.2. Preparo do tecido conservado em RNA <i>later</i> e formol.....	46
4.2.3. Preparo do tecido emblocado em parafina.....	46
4.2.4. Isolamento e quantificação do DNA.....	47
4.2.5. Análise da qualidade da amostra.....	47
4.2.6. Técnicas de Triagem Genômica.....	48
4.2.6.1. Técnica de MLPA.....	48
4.2.6.1.1. Análise dos Resultados da MLPA.....	49
4.2.6.2. Técnica de Marcadores de Microssatélite (MMS).....	49
4.2.7. Técnicas auxiliares e confirmatórias.....	50
4.2.7.1. <i>Real Time</i> PCR (qPCR).....	50
4.2.7.2. Técnica de triagem genômica por <i>array</i>	51
4.2.7.3. FISH em tecido parafinado.....	51
4.2.7.3.1. FISH em células obtidas por dissociação tecidual.....	51

4.2.7.3.2. FISH em corte histológico.....	52
4.2.7.4. Sequenciamento pelo método de Sanger - Éxon 7 do gene <i>FGFR3</i>	53
4.2.8. Fluxograma de Trabalho.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Análise Citogenômica.....	60
5.1.1. Aneuploidias.....	60
5.1.2. Microdeleções e microduplicações.....	74
5.1.3. Mutações de ponto.....	78
5.1.4. Outras anormalidades.....	79
5.1.5. Pacientes sem alterações.....	81
5.1.6. Casos controles.....	82
6. DISCUSSÃO.....	85
6.1. Aneuploidias.....	86
6.2. Microdeleções e Microduplicações.....	90
6.3. Mutação de Ponto.....	93
6.4. Outras anormalidades.....	94
6.5. Implantação das Técnicas.....	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8. CONCLUSÕES.....	99
9. ANEXOS.....	101
ANEXO A - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P095 A2/A3 da MLPA..	102
ANEXO B - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P064 B2/B3 da MLPA..	104
ANEXO C - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P064 C1 da MLPA.....	106
ANEXO D - Tabela das sondas disponíveis no <i>kit</i> P070 B2 da MLPA.....	108
ANEXO E – Modelo de laudo para testes citogenômicos em tecido.....	110
ANEXO F – Resultado das médias das quantificações e razões de pureza das amostras de DNA, conforme o tipo de conservante utilizado no tecido	111
ANEXO G – Imagem da corrida eletroforética de amostras de DNA de tecidos conservados em RNA <i>later</i>	112
ANEXO H – Imagem da corrida eletroforética de amostras de DNA de tecidos conservados em formol e parafina.....	113
10. REFERÊNCIAS.....	114
11. APÊNDICES.....	123

LISTAS

Lista de Figuras

Figura 1 - Não-disjunção cromossômica no ciclo de divisão meiótico e mitótico, originando perfil celular alterado não-mosaico e mosaico.....	34
Figura 2 - Resultados da investigação citogenômica.....	56
Figura 3 - Sinais fenotípicos do paciente 2.....	61
Figura 4 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 para fígado, pele e coração do paciente 2.....	61
Figura 5 - Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS em fígado, pele e coração do paciente 2.....	62
Figura 6 - Resultado do teste de <i>array</i> para o cromossomo 21 no coração do paciente 2.....	63
Figura 7 - Imagens da FISH utilizando sonda LPE 13/21 células cardíacas do paciente 2.....	64
Figura 8 - Imagens da FISH utilizando sonda <i>EWSR1/ERG Translocation, Dual Fusion LPS 008</i> em cortes histológicos de fígado, pele e coração do paciente 2.....	64
Figura 9 - Sinais fenotípicos do paciente 13 e resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 no cérebro.....	65
Figura 10 - Sinais fenotípicos do paciente 7 e resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 para no fígado.....	67
Figura 11 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 para o diafragma do paciente 18.....	68
Figura 12 - Sinais fenotípicos do paciente 20, resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 para o cérebro e da MMS para a pele.....	69
Figura 13 - Sinais fenotípicos do paciente 29 e resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 para o diafragma.....	70
Figura 14 - Sinais fenotípicos do paciente 16.....	71
Figura 15 - Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS em fígado revelando a presença de trissomia do cromossomo 13 para o paciente 16.....	71
Figura 16 - Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS em diafragma revelando a presença de trissomia do cromossomo 13 para o paciente 16.....	71
Figura 17 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 em fígado revelando a presença de sondas para o cromossomo Y no paciente 17, com diagnóstico prévio 45,X.....	72
Figura 18 - Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS em fígado revelando a presença de alelos para X e Y do paciente 17.....	73
Figura 19 - Imagem da FISH utilizando sonda centromérica para X e Y, em corte histológico de fígado, revelando a presença de células monossômicas para o cromossomo X, dissômicas (XX) e dissômicas (XY) para o paciente 17.....	74

Figura 20 - Imagem da FISH utilizando sonda centromérica para X e Y, em células de cérebro, revelando a presença de células monossômicas para o cromossomo X e dissômicas (XY) para o paciente 17.....	74
Figura 21 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P095 revelando duplicação do gene <i>TYMS</i> em 18p11.32 na pele para o paciente 1.....	75
Figura 22 - Em (a) Sinais fenotípicos do paciente 3 e em (b) Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P070 revelando a deleção do gene <i>CHL1</i> em 3p26.3 no fígado.....	76
Figura 23 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P064 revelando deleção do gene <i>HIC1</i> em 17p13.3 na pele e no cérebro do paciente 4.....	77
Figura 24 - Resultado da MLPA com o <i>kit</i> P064 revelando a deleção do gene <i>TOM1L2</i> em 17p11.2 na pele e no cérebro para o paciente 28.....	78
Figura 25 - Sinais fenotípicos do paciente 30 evidenciando a presença de encurtamento dos membros, sugestivo de Displasia Tanatofórica tipo I (DTI).....	79
Figura 26 - Eletroferograma evidenciando a mutação c.746C>G – S249C em heterozigose no fígado do paciente 30.....	79
Figura 27 - Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o <i>kit</i> P095 revelando número de cópias gênicas normais para o sexo feminino para o paciente 6 na pele.....	80
Figura 28 - Sinais fenotípicos evidenciando a genitália ambígua do paciente 19...	81
Figura 29 - Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS no fígado do paciente 19, mostrando a presença do marcador para o cromossomo X.....	81
Figura 30 - Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o <i>kit</i> P095 – A2/A3 - revelando número de cópias gênicas normais para a pele de controles e casos normais.....	82
Figura 31 - Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o <i>kit</i> P064 – B2/B3 - revelando número de cópias gênicas normais para a pele de controles e casos normais.....	83
Figura 32 - Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o <i>kit</i> P070 – B2 - revelando número de cópias gênicas normais para a pele de controles e casos normais.....	83
Figura 33 - Análise de STRs com o <i>kit</i> Minifiler com número de alelos normais para os marcadores do kit – sexo masculino – para a pele de controles e casos normais.....	84
Figura 34 - Análise de STRs com o <i>kit</i> Minifiler com número de alelos normais para os marcadores do kit – sexo feminino – para a pele de controles e casos normais.....	84

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1 -	Número de amostras e pacientes coletados, selecionados e excluídos do estudo.....	45
Fluxograma 2 -	Fluxo para investigação citogenômica.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Detalhes da análise citogenômica em 30 casos analisados.....	58
Tabela 2 -	Resultado da análise da FISH nos três tecidos avaliados com a utilização da sonda EWSR1/ERG <i>Translocation, Dual Fusion LPS 008 – Cytocell</i>	65
Tabela 3 -	Relação entre as sondas de MLPA duplicadas, região genômica e fenótipo.....	88

RESUMO E ABSTRACT

Dias, AT. *Investigação citogenômica tecidual post-mortem em portadores de malformações congênitas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: As malformações congênitas (MCs) são a segunda causa de mortes fetais e infantis no Brasil e, em grande parte dos casos, a sua etiologia não é bem definida. Devido às consequências clínicas das MCs, alguns pacientes falecem sem tempo hábil para uma investigação etiológica acurada. Dessa forma, a maioria dos casos permanece sem uma confirmação molecular das suspeitas clínicas, dificultando o aconselhamento genético para as famílias. **Objetivos:** O presente trabalho utilizou técnicas citogenômicas para caracterizar molecularmente a presença de anormalidades no DNA, desde aneuploidias até a variação do número de cópias gênicas (CNVs) em diferentes tecidos de pacientes falecidos portadores de MC encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbitos para avaliação anatomopatológica. **Casuística e Métodos:** Foram avaliadas amostras de 30 pacientes portadores de MC submetidos à necropsia. O DNA foi extraído de diferentes tecidos (cérebro, coração, fígado, pele e diafragma) previamente conservados em RNA *later*, formol ou emblocados em parafina. Foram utilizadas as técnicas de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) com os kits P095, P064 e P070 (MRC-Holland®), Marcadores Microssatélites (MMS) com o kit MiniFiler (Life Technologies®), a *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH), a técnica de array (*Infinium® CytoSNP-850K BeadChip - Illumina*) e o Sequenciamento Bidirecional por Sanger. A interpretação dos resultados foi realizada utilizando os softwares *GeneMarker*, *Coffalyser*, *BlueFuse Multi*, *Sequencher* e com os 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>) e *Mutation Taster*. **Resultados:** Dos 30 pacientes avaliados, 13 apresentaram alterações patogênicas. Entre eles, oito apresentaram aneuploidias envolvendo os cromossomos 13, 18, 21, X e Y, sendo dois deles com mosaicismo intratecidual. Quatro pacientes apresentaram microdeleções ou microduplicações envolvendo diferentes

genes, sendo um paciente com duplicação do gene *TYMS* em 18p11.32; um com deleção do gene *CHL1* em 3p26.3; um com deleção para o gene *HIC1* em 17p13.3 e um paciente com deleção do gene *TOM1L2* em 17p11.2; um paciente apresentou mutação de base única, patogênica, g.8535C>G (c.746C>G) no éxon 7 do gene *FGFR3* compatível com Displasia Tanatofórica tipo I. Por fim, dois pacientes com doenças do desenvolvimento sexual apresentaram resultados dos testes citogenômicos normais. **Discussão:** Sugere-se que todas as alterações encontradas estão relacionadas ao fenótipo clínico ou participam na via de sinalização de genes correlatos. As técnicas de MLPA e MMS mostraram viabilidade e eficiência para a detecção de alterações genômicas em tecidos de pacientes falecidos, contudo são dependentes da integridade e quantidade do DNA obtido. **Conclusão:** O estudo citogenômico *post-mortem* é importante para a elucidação diagnóstica de casos sem etiologia definida, para o aconselhamento genético familiar, para a caracterização de mosaicismo inter e intratecidual e para a compreensão da patogênese das MCs.

Descritores: Anormalidades congênitas; Mortalidade infantil; Patologia molecular; Reação em cadeia da polimerase multiplex; Variações do número de cópias de DNA.

Dias, AT. *Post-mortem tissue cytogenomics investigation in patients with congenital malformations* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Introduction: Congenital malformations (CMs) are the second leading cause of fetal and infant deaths in Brazil and in most cases the etiology is not well defined. Also, the patients remain without a conclusive diagnostic making difficult the genetic counseling. **Objectives:** This study applied cytogenomics techniques in order to characterize the presence of DNA abnormalities, as well as, aneuploidies and genomic copy number variations (CNVs) in different tissues from deceased patients with CM from “Serviço de Verificação de Óbitos”. **Patients and Methods:** We evaluated samples from 30 patients undergoing necropsy. The DNA was extracted from different tissues (brain, heart, liver, skin and diaphragm) stored in RNA later, formaldehyde and embedded in paraffin. We performed Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) with P095 kits, P064 and P070 (MRC-Holland®), microsatellite markers (MMS) with MiniFiler kit (Life Technologies), Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), array technique (Infinium® CytoSNP-850K BeadChip - Illumina) and bidirectional sequencing by Sanger. The results was analyzed using different softwares: GeneMarker, Coffalyser, BlueFuse Multi Sequencer and databases 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>) and Mutation Taster. **Results:** The results showed 13 patients with pathogenic CNVs, and among them, eight presented aneuploidies involving chromosomes 13, 18, 21, X and Y. Two of them presented intra-tissue mosaicism. Also four patients showed several different microdeletions or microduplications: duplication of *TYMS* gene (18p11.32); deletion of *CHL1* gene (3p26.3); deletion of *HIC1* gene (17p13.3); deletion of *TOM1L2* gene (17p11.2). One patient showed a pathogenic missense mutation of g.8535C>G (c.746C>G) in exon 7 from *FGFR3* gene compatible with Thanatophoric Dysplasia type I. And two patients presented sexual development disorders and

normal molecular results. **Discussion:** We conclude that the genomic abnormalities found in different tissues are pathogenic and associated to clinic manifestations in all patients studied. Besides, the cytogenomic techniques applied were efficient to help in the conclusive diagnostic; however, there are dependent of integrity and quality of DNA. **Conclusion:** Indeed the *post-mortem* cytogenomic study is crucial to genetic counseling, to characterize the presence of intra-tissue mosaicism and also to better understand the pathogenesis of congenital malformations.

Descriptors: **Congenital abnormalities; Infant mortality; Molecular pathology; Multiplex polymerase chain reaction; DNA copy number variations.**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O termo malformação congênita (MC) é definido como uma anomalia morfológica, estrutural ou funcional presente ao nascimento. As MCs são classificadas em dois grandes grupos: as maiores, de importante relevância clínica e, as menores, de elevada frequência sem grandes consequências médicas aos seus portadores (Horovitz et al., 2005; Amorim et al., 2006; Pereira et al., 2008).

As MCs podem ter etiologia genética (30-40% dos casos), ambiental (5-10% dos casos) ou idiopática (~50% dos casos), sendo que as anormalidades cromossômicas respondem por aproximadamente 6% dos recém-nascidos malformados, as doenças monogênicas por 25% e as de origem multifatorial por 20-30% dos casos (Obu et al., 2012).

As malformações congênitas representam um importante impacto para o sistema de saúde pública figurando como a segunda causa de mortes fetais e infantis no Brasil, sendo que, no ano de 2014 foram registrados 10.055 óbitos classificados pelo CID-10 no capítulo XVII “*malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas*” em todo território nacional (DATASUS, 2015). Constata-se que a maioria desses óbitos tem sua etiologia indefinida, dificultando a elucidação diagnóstica e o aconselhamento genético para as famílias.

Nesse sentido, os diferentes métodos citogenômicos, abrangendo desde a cariotipagem clássica até a triagem do genoma completo pela técnica de *array*, são os testes mais indicados para estudo molecular e para a confirmação das suspeitas clínicas em pacientes malformados.

Dependendo da situação, o estudo cromossômico clássico por bandamento G em linfócitos do sangue periférico é a ferramenta mais utilizada na rotina diagnóstica de portadores de MCs, entretanto, como a maioria dos conceitos malformados graves tem uma sobrevida curta, a investigação diagnóstica por esse método não é realizada ou torna-se inviável (Lescoat et al., 2005; Gniady et al., 2010; Cerada & Carey, 2012).

Neste cenário, a necropsia e o estudo anatomopatológico e radiológico são as alternativas para se relatar a *causa mortis* dos portadores de MCs e para se suspeitar da presença de alterações genômicas, principalmente quando o estudo molecular não foi realizado durante o período pré ou pós-natal. Desta forma, muitos casos permanecem sem conclusão etiológica definida, sendo uma possível solução a escolha de métodos citogenômicos utilizando amostras teciduais *post-mortem* (Gniady et al., 2010; Wapner, 2010).

A aplicação eficiente destas técnicas permite a identificação inequívoca de aneuploidias, da variação do número de cópias genômicas (CNVs) e de mutações em diferentes tecidos de um mesmo indivíduo, esclarecendo as causas associadas aos quadros malformativos.

————— REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Malformações Congênitas

A morfogênese é o processo de formação das estruturas que compõe o organismo humano. A condução da morfogênese é determinada de acordo com fatores genéticos, ordenados em redes de interações e expressões gênicas. Quando o equilíbrio genômico é perturbado, o processo de formação das estruturas na embriogênese é prejudicado, levando ao surgimento das MCs (Srivastava et al., 2006).

De acordo com padrões fisiopatogênicos, as anormalidades congênitas são classificadas em quatro categorias distintas: as malformações, as deformidades, as disrupções e as displasias (Hennekam et al., 2013).

As malformações são alterações morfológicas decorrentes do desenvolvimento anormal de um tecido, órgão ou sistema, resultado de morfogênese incompleta, de formação de tecido anormal, de presença de tecido acessório e de alterações nas funções dos tecidos; as deformidades são anomalias resultantes de forças mecânicas ou traumatismos que alteram a morfologia dos tecidos; as disrupções ocorrem quando um determinado tecido é submetido a um evento que destrói sua estrutura previamente normal formada e, as displasias são causadas por erro na organização celular intrínseca aos tecidos (Hennekam et al., 2013).

Na embriogênese, as anomalias congênitas são caracterizadas como isoladas (quando não estão associadas a nenhum outro defeito), síndromes (quando há múltiplos defeitos envolvendo diferentes tecidos sem uma origem morfogênica identificável) e sequências (quando o quadro malformativo é originado por um defeito inicial que desencadeia as demais anomalias) (Hennekam et al., 2013).

As MCs são divididas em dois grandes grupos: MCs maiores e MCs menores. As malformações maiores são classificadas sistematicamente e diferenciadas em cardíacas, neurológicas, renais, genito-urinárias, gastro-

intestinais e esqueléticas (Rasmussen et al., 2003; Amorim et al., 2006; Pereira et al., 2008; Saxena, 2010; Hennekam et al., 2013).

As malformações cardíacas são divididas em quatro grupos: as cianóticas (Tetralogia de Fallot, Transposição de Grandes Vasos, Atresia de Tricúspide, Atresia Pulmonar, Síndrome do Coração Esquerdo Hipoplásico, *Truncus Arteriosus*), as acianóticas (Coartação de aorta), as derivações da esquerda para a direita (Persistência do Canal Arterial, Defeito de Septo Atrioventricular) e as obstrutivas (Estenose de Aorta e de Artéria Pulmonar). (Rasmussen et al., 2003).

Dentre as malformações renais e do sistema genito-urinário destacam-se a agenesia e hipoplasia renal, as disgenesias gonadais e as hipospádias de segundo ou terceiro grau. No grupo das anomalias neurológicas, destacam-se a hidrocefalia (de maior incidência) e os defeitos de fechamento do tubo neural (espinha bífida, holoprosencefalia, anencefalia, encefalocele, mielomeningocele, lisenssefalia). (Rasmussen et al., 2003).

No sistema gastro-intestinal, destacam-se as atresias e estenoses de esôfago e intestino e, nos defeitos do fechamento de parede abdominal, a onfalocele e a gastrosquise. Nas alterações esqueléticas estão presentes as craniosinostoses e cranioestenoses, os encurtamentos de membros e demais alterações morfológicas. Nas anomalias oculares destacam-se a anoftalmia, microftalmia, glaucoma e a catarata (Rasmussen et al., 2003; Saxena, 2010).

Quanto à incidência das MCs maiores em neonatos, as do Sistema Nervoso Central são as mais presentes (10/1.000), seguido das cardíacas (8/1.000), renais (4/1.000) e de membros (1/1.000). Os demais sistemas, juntos, acometem 6/1.000 neonatos (Obu et al., 2012).

Com relação às MCs menores, estas ocorrem com maior frequência na população e se apresentam das mais variadas formas, destacando-se as microfossetas, apêndices, mamilos extranumerários, nevus hiper-hipopigmentados, hipertelorismos, entre outras (Rasmussen et al., 2003).

As manifestações clínicas decorrentes das MCs podem ocorrer a qualquer momento da vida do seu portador. Este evento está relacionado com as condições clínicas de cada indivíduo, com o tipo de órgão acometido e com o grau de comprometimento do órgão (Saxena, 2010).

Como fatores de risco para o desenvolvimento das MCs, destacam-se a idade materna avançada, história familiar de MCs, deficiências nutricionais, exposição da gestante a riscos físicos, drogas, fármacos e fatores teratogênicos (Polita et al., 2013).

2.2. Alterações no DNA associadas às Malformações Congênitas

Os primeiros estudos relacionando alterações no DNA e os quadros malformativos ocorreram na década de 50, tendo seu marco com o estudo de Lejeune e colaboradores, que descreveram a presença de um cromossomo extranumerário no cariótipo de pacientes com Síndrome de Down (Kulikowski et al., 2013).

As anormalidades no DNA podem ocorrer como ganho ou perda de um cromossomo inteiro no cariótipo ($2n=46$) da espécie humana, constituindo as aneuploidias, ou como as alterações na estrutura do DNA, caracterizadas pela reorganização anormal do material genômico (Kulikowski et al., 2013).

As alterações estruturais podem ser equilibradas ou não-equilibradas. Dentre as equilibradas destacam-se as translocações, inversões e inserções. Já as alterações não-equilibradas resultam efetivamente em perdas e ganhos de material genético, que incluem as deleções e as duplicações genômicas. Estas anormalidades podem envolver desde grandes regiões cromossômicas ou até um único nucleotídeo, como os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (Feuk et al., 2006).

Recentemente foi reconhecida outra forma de variação estrutural do genoma, as Variações no Número de Cópias Gênicas (do inglês *Copy Number Variation* – CNVs), que são definidas como fragmentos de DNA de aproximadamente 1kb (que podem ter o tamanho de 50 pb a muitos megabases) que variam no número de cópias no genoma (Campos et al., 2014; Connolly et al., 2014). As CNVs podem afetar a função dos genes envolvidos por interrupção da região codificadora ou reguladora, pela geração de um gene quimérico ou por efeito de posição e, dessa forma serem consideradas patogênicas. Caso as CNVs não acarretem efeito fenotípico aos portadores, estas são denominadas benignas e, se apresentarem

patogenicidade incerta, denominam-se VOUS (CNVs de significado incerto) (Miller et al., 2010; Connolly et al., 2014).

A literatura mostra que as CNVs contribuem para o desequilíbrio gênico-celular perturbando o processo de desenvolvimento embrionário, proporcionando assim o surgimento de anomalias congênitas. (Lu et al., 2008; Lupski, 2015).

As CNVs são as maiores fontes de variabilidade entre as pessoas. Entretanto, as CNVs patogênicas podem alterar vias sensíveis à dosagem genômica causando alterações fenotípicas devido à perda de função gênica, resultando em haploinsuficiência, ou a ganho de função, com superexpressão genômica. Os resultados destas alterações patogênicas são associadas a doenças, síndromes e quadro malformativos (Sun et al., 2013; Lupski, 2015).

A variação genética entre os indivíduos tem sido amplamente explorada (Zhang et al., 2009), mas, a investigação para determinar a variação genômica no mesmo organismo ainda é escassa. Esta informação é importante para entender qual o papel dessa variabilidade para o fenótipo clínico e sua contribuição no desenvolvimento das malformações congênitas.

Achados recentes sugerem que as linhagens celulares *in vitro* apresentam uma diferença significativa no número de cópias gênicas, entretanto, ainda não está bem claro se essas variações também se repetem *in vivo* nas diferentes populações celulares somáticas humanas (O'Huallachain et al., 2012).

Evidências da presença de CNVs já foram encontradas em populações de células-tronco embrionárias humanas e em populações de células-tronco pluripotentes induzidas, reforçando a possibilidade de que populações celulares genomicamente diferentes possam conviver no mesmo indivíduo. Desta forma, é caracterizado o mosaicismismo somático pervasivo que pode influenciar diretamente no equilíbrio fenotípico (Mkrtchyan et al., 2010).

O mosaicismismo somático acontece quando populações geneticamente distintas de células somáticas convivem dentro de um organismo e até dentro do mesmo tecido. As alterações genômicas em mosaico também estão presentes em muitos tipos de câncer, sendo que, um número superior a 30 doenças mendelianas está associado à presença de mosaicismismo somático (Wada e Candotti, 2008).

2.2.1. Mosaicismo associado às Malformações Congênitas

O mosaicismo pode se apresentar em qualquer nível de alteração no DNA, desde cromossômico até mutações de ponto. Em determinados casos, as anormalidades genômicas causam graves manifestações clínicas ao seu portador, sendo apenas compatível com a vida sua apresentação na forma de mosaico. Ainda, deve-se ressaltar que o quadro clínico de pacientes com alterações no DNA em mosaico pode ser variável, o que dificulta a correta relação genótipo-fenótipo dos seus portadores. (Biesecker e Spinner, 2013).

As alterações no DNA podem ser causadas de diferentes maneiras: por erros de disjunção cromossômica durante as fases de divisão do ciclo celular, por pareamento desigual entre cromossomos homólogos ou de cromátides-irmãs e por falhas nos processos de reparo do DNA. Quando o erro acontece durante a meiose (pré-formação do zigoto), esta alteração originalmente acometerá todas as células do seu portador. Já, caso este ocorra durante a mitose (pós-fecundação), esta anormalidade se apresentará na forma de mosaico (Biesecker e Spinner, 2013).

A figura 1 ilustra a origem de alteração cromossômica numérica celular durante os ciclos de divisão meiótico e mitótico, por erro de disjunção cromossômica, com ênfase em *b* para o mosaicismo genético.

Figura 1 – Não-disjunção cromossômica no ciclo de divisão meiótico (a) e mitótico (b), originando perfil celular alterado não-mosaico e mosaico.

Presente em cerca de 1/10.000 indivíduos, o mosaicismo é um fenômeno

relativamente comum e de difícil caracterização, uma vez que pode se apresentar restrito a determinado tecido, em todos os tecidos de maneira equilibrada ou com distribuição independente intratecidual (Paskulin et al., 2011; Biesecker e Spinner, 2013).

No mosaicismo, o número de células alteradas e normais nos diversos tecidos do organismo humano pode não estar homogeneamente distribuído. Papavassiliou e colaboradores demonstraram que em pacientes mosaicos para trissomia do cromossomo 21, a proporção de células alteradas em mucosa oral e no sangue periférico é consideravelmente diferente, e que tais predominâncias estão relacionadas com a expressão fenotípica dos tecidos (Papavassiliou et al., 2009).

Com o avanço das técnicas moleculares, as alterações genômicas restritas a tecidos podem ser estudadas de forma cada vez mais detalhadas. Golabi e colaboradores, utilizando técnicas de citogenética molecular, apresentaram um caso de um paciente portador de múltiplas malformações congênitas com monossomia do cromossomo 13 em fibroblastos e cariótipo normal em linfócitos do sangue periférico. Esse estudo mostrou claramente a importância da investigação em diferentes tecidos, uma vez que somente a análise em sangue periférico levaria a uma investigação etiológica equivocada (Golabi et al., 2010).

2.2.1.1. Mosaicismo intratecidual e mosaicismo tecido-específico

A detecção do mosaicismo tecido-específico é um dos grandes desafios da medicina personalizada para a correta determinação genótipo-fenótipo dos seus portadores (Biesecker e Spinner, 2013).

O mosaicismo pode estar presente em todas as células do organismo, em tecidos específicos ou apresentar distribuição irregular intratecidual. O mosaicismo tecido-específico se dá quando determinada alteração genômica está presente apenas naquele tecido ou em sua linhagem de origem embrionária (Biesecker e Spinner, 2013).

Já, o mosaicismo intratecidual é determinado pelo perfil genômico celular diferenciado, seja normal e alterado, hipermetilado e hipometilado, entre

populações celulares de um mesmo tecido (Pretto et al., 2014).

Diferentes técnicas de investigação são possíveis de serem utilizadas para a caracterização da presença de mosaicismo. Por exemplo, os portadores da Síndrome de Pallister-Killian são acometidos por mosaicismo tecido-específico configurado pela presença de um isocromossomo supranumerário de 12p, restrito aos fibroblastos. Costa e colaboradores mostraram que é possível a utilização das técnicas de Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) para a distinção do mosaicismo intertecidual nesses pacientes (Costa et al., 2015).

A investigação utilizando-se técnicas moleculares com maior resolução, como os *arrays* possibilitam detectar graus diferenciados de mosaicismo intratecidual (Gerdes et al., 2008; van Veghel-Plandsoen et al., 2011; Biesecker e Spinner, 2013).

Devido à dificuldade de caracterização de alguns tecidos que são inacessíveis em pacientes vivos, a presença das alterações genômicas tecido-específico pode estar subestimada na população. Dessa forma, o estudo citogenômico *post-mortem* permite o acesso a diferentes tecidos e pode viabilizar uma caracterização molecular mais acurada da presença de mosaicismo tecidual (Paskulin et al., 2011).

2.3. Análise Genômica de tecidos *post-mortem*

A utilização de tecnologias cada vez mais sensíveis para a caracterização molecular dos tecidos *post-mortem*, como a MLPA, a FISH, as plataformas de *array* e o sequenciamento de última geração viabilizou a detecção de anormalidades genômicas antes desconhecidas, aprofundando a compreensão da relação genótipo-fenótipo das doenças associadas às MCs, propiciando a determinados casos a conclusão diagnóstica.

Para a realização dos testes citogenômicos em amostras *post-mortem*, o processo de conservação do tecido é fundamental para garantir uma boa qualidade do material genético. Logo, o DNA dessas amostras geralmente está prejudicado devido ao tempo de espera para a obtenção do tecido (necropsia) e para a extração do DNA (Okello et al., 2010), sendo esse um dos motivos

que impede que esse estudo possa ser conduzido de forma rotineira em muitos laboratórios.

Assim, poucos laboratórios empregam um seguimento diagnóstico relacionado com a investigação genética *post-mortem*. Quando disponível, essa investigação é realizada apenas em amostras de sangue ou em tecidos frescos congelados (<http://personalizedmedicine.partners.org/Laboratory-For-Molecular-Medicine/Ordering/Sample-Requirements-Payment-Shipping.aspx>).

Desse modo, mesmo que a associação entre as mutações citogenômicas e anormalidades cromossômicas relacionadas às malformações congênitas já seja um consenso na literatura, a detecção da heterogeneidade molecular das diferentes populações celulares e sua validação ainda apresenta dificuldades.

Nesse sentido, as técnicas citogenômicas capazes de contribuir para essa caracterização e que foram empregadas nesse trabalho são brevemente comentadas a seguir.

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

A utilização da técnica de MLPA é uma alternativa metodológica com excelente relação custo-benefício para a detecção de microrrearranjos (duplicações e deleções) no genoma investigado. Esta técnica avalia cerca de 40 regiões de interesse clínico diferentes em um único experimento, é uma estratégia de triagem genômica quantitativa eficaz, eficiente e efetiva, que contempla a detecção de grandes alterações (aneuploidias) e as pequenas CNVs baseadas em uma hipótese diagnóstica (Christofolini et al., 2010; Dutra et al., 2011).

A MLPA consiste na hibridação genômica de aproximadamente 40 sondas (entre controles internos da reação e regiões de interesse clínico) e, caso esta região esteja presente, a hibridação acontece e, caso não, a sonda não se anela. Esta sonda é marcada com uma sequência *stuffer*, que diferencia cada fragmento em tamanhos diferentes e uma região de homologia entre todas as sondas do teste. Desta forma, com a utilização de um par de primers universal, as sondas são amplificadas e é realizado o sequenciamento destes fragmentos. Os resultados são liberados por eletroferogramas que identificam,

a partir de um controle normal, o ganho e/ou a perda de material genético nas regiões investigadas (Schouten et al., 2002).

A técnica de MLPA é amplamente discutida na literatura e utilizada como método diagnóstico para diferentes doenças. A sua aplicação na necropsia molecular ainda é rara, entretanto deve ser considerada uma alternativa diagnóstica relevante para se trabalhar com amostras de DNA menos íntegras.

Com relação à detecção de mosaicismo, van Veghel-Plandsoen e colaboradores apresentaram estudo em que a técnica de MLPA foi capaz de detectar níveis de anormalidades no DNA em cerca de 40% da população celular. Desta forma, pode-se considerar a MLPA uma ferramenta molecular para investigar alterações tecido-específicas e intrateciduals em mosaico (van Veghel-Plandsoen et al., 2011).

2.3.2. Análise de Marcadores Microsatélite (MMS) - *Short Tandem Repeats* (STRs) por sequenciamento de DNA

A técnica de análise de MMS é uma metodologia muito utilizada para investigação de alterações genômicas, teste de paternidade e análise forense. Passível de ser empregada mesmo quando o DNA tem baixa qualidade ou com pouca concentração, baseia-se na análise de pequenas repetições sequenciais de DNA (STR – *Short Tandem Repeats*) e possibilita a identificação de pessoas, a avaliação quanto à origem e número de alelos entre diferentes tecidos e o estudo de gêmeos quanto à zigosidade (mono ou dizigóticos) (Hughes-Stamm SR et al., 2011).

O método de MMS é uma alternativa de investigação de alterações numéricas em amostras de DNA prejudicadas, uma vez que conforme o *Kit* selecionado para a realização do teste, utiliza um número menor de regiões-alvo específicas possibilitando a obtenção de resultados consistentes com a suspeita clínica (Dias et al., 2014).

2.3.3. *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH)

A FISH é uma técnica amplamente discutida na literatura que, baseada na

homologia entre uma sonda de DNA marcada com fluorescência e o material alvo da pesquisa (células e tecidos), pode-se determinar perdas, ganhos e rearranjos de regiões específicas do genoma de maneira rápida e sensível sob microscopia de fluorescência (Pinkel et al., 1986; Trask, 2002).

A FISH possui alta especificidade e sensibilidade. Considerada padrão-ouro no diagnóstico de muitas doenças genômicas, possui como vantagens a rapidez na sua execução e confiabilidade nos resultados. Em contrapartida, por ter um elevado custo e ser alvo-específica, não é uma técnica utilizada para triagem genômica (Hochstenbach et al., 2009).

A FISH em amostras teciduais é amplamente utilizada para a confirmação de alterações específicas no DNA já conhecidas. A FISH deve ser considerada uma ferramenta de investigação complementar à triagem genômica realizada durante a necropsia molecular, com importante aplicabilidade para validar os casos de suspeita de mosaicismo inter e intratecidual.

2.3.4. Triagem Genômica Completa por Array

Os testes baseados na técnica de *array* são ferramentas de alta resolução que possibilitam a identificação de ganhos e perdas de microrregiões genômicas em um único experimento. O experimento consiste na hibridação do material do paciente nas lâminas ou *chips* de *array* e, por intensidade do sinal fluorescente, pode-se determinar tais alterações quantitativamente (Vermeesch et al., 2007).

Os *arrays* diferenciam-se de acordo com a sua metodologia ou resolução das lâminas ou *chips*. O CGH-*array* (Hibridação Genômica Comparativa por *array*) consiste na hibridação simultânea entre DNA controle e DNA do paciente que, de acordo com o desequilíbrio genômico do paciente, teremos predominância de sinais marcados do paciente ou do controle, refletindo em duplicações ou deleções respectivamente. Caso haja homogenia entre os sinais, considera-se que o paciente é normal para o teste (Vermeesch et al., 2007).

A metodologia de SNP-*arrays* não utiliza DNA controle na hibridação. A partir de sequências de oligonucleotídeos presentes nas lâminas ou *chips*, o

DNA do paciente é hibridado e os resultados são analisados e contrapostos para a liberação e conclusão do teste (Vermeesch et al., 2007).

Quanto à resolução das lâminas ou *chips*, esta influencia diretamente na cobertura do genoma e no espaçamento entre cada região a ser investigada. Quanto maior a resolução de um teste, maior a cobertura da região ou do genoma avaliado (Vermeesch et al., 2007).

A tecnologia dos *arrays* aplicada à necropsia molecular é factível, entretanto, dependente de alguns fatores como integridade e quantidade do DNA. Os processos de formalização e de emblocamento dos tecidos em parafina degradam o material genético, fragmentando o DNA em pequenas sequências genômicas de 200 pb ou menos. Desta forma, a sua aplicação para detectar alterações de número de cópias genômicas em amostras *post-mortem* deve ser avaliada cuidadosamente, considerando-se que nem sempre esta será uma opção válida para se trabalhar com amostras prejudicadas (Rowe et al., 2013).

Assim, a proposta do presente trabalho foi investigar a presença de alterações moleculares utilizando técnicas de citogenômica em diferentes tecidos de pacientes com MCs falecidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A execução deste trabalho possibilitou realizar uma abordagem genótipo-fenótipo inédita para os pacientes malformados falecidos sem diagnóstico, revelando a presença de mosaicismos genômicos inter e intratecidual e suas implicações clínicas.

Os detalhes dessa investigação estão descritos e discutidos nos tópicos a seguir.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Estudar as alterações genômicas em amostras *post-mortem* de pacientes com MCs.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar a técnica MLPA para amostras de tecidos obtidas *post-mortem*;
- ✓ Investigar a presença de alterações genômicas tecido-específicas;
- ✓ Relacionar o genótipo com o fenótipo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Para a realização do presente trabalho foram selecionados 50 pacientes com MCs falecidos e submetidos à necropsia no Serviço de Verificação de Óbitos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período 2009 a 2014.

A investigação citogenômica destes pacientes foi realizada no Laboratório de Citogenômica do LIM 03 do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em diferentes amostras teciduais.

Como critérios de inclusão, foram considerados todos os pacientes, de ambos os sexos, com uma ou mais MCs maiores associadas a quadros sindrômicos ou não, casos de natimortos e fetos malformados, independente da realização de testes citogenéticos e moleculares prévios.

Como critérios de exclusão, foram considerados erros de identificação das amostras e dos pacientes, indisponibilidade do teste diagnóstico no laboratório, coleta de inadequada das amostras (erros de identificação e de conservação) e pacientes com sorologia positiva.

Assim, foram avaliados 34 pacientes, sendo 4 casos controles (neonatos falecidos sem a presença de MCs diagnosticadas - 3 homens e 1 mulher), conforme ilustrado no fluxograma 1.

Os tecidos selecionados para a investigação foram cérebro, coração, fígado, pele e/ou diafragma, sendo a coleta condicionada à disponibilidade e não descaracterização da peça. Em apenas um paciente, foi coletado um fragmento de pulmão. A necropsia é realizada em aproximadamente 6 horas após o falecimento ou no momento da reclamação do corpo pela família.

O estudo foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da USP com número 0461/11 em 08 de agosto de 2011.

Fluxograma 1 - Número de amostras, pacientes e controles coletados, selecionados e excluídos do estudo.

4.2. Metodologia

4.2.1. Coleta dos tecidos e conservação

Amostras oriundas de peças anatômicas do Departamento de Patologia foram coletadas em três momentos distintos: (1) Durante a realização da necropsia, utilizando como conservante RNA *later*; (2) No momento da dissecação, e os tecidos foram conservados em formol e (3) Após emblocamento em parafina.

As amostras conservadas em RNA *later* foram mantidas por aproximadamente 3 dias sob temperatura ambiente para subsequente extração de DNA. As amostras conservadas em formol tamponado à 10% foram mantidas por aproximadamente 2 semanas sob temperatura ambiente para posterior manipulação.

As amostras emblocadas em parafina foram obtidas do banco de blocos do Departamento de Patologia, sendo selecionadas as amostras do ano de 2009.

Os fragmentos de tecidos conservados em RNA *later* e formol foram encaminhados para processamento, no Laboratório de Citogenômica, imediatamente após a coleta e dissecação respectivamente. Os cortes dos tecidos emblocados em parafina foram realizados na Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da FMUSP e encaminhados ao laboratório para utilização.

4.2.2. Preparo do tecido conservado em RNA *later* e formol

Fragmentos de aproximadamente 1 cm² do tecido colhido foi colocado em um tubo cônico de 1,5 mL contendo aproximadamente 500 µL de RNA *later* (Ambion, USA) ou formol tamponado.

Para a realização da extração do DNA, foi utilizado aproximadamente 25 mg de tecido, e o material foi seccionado em pequenos fragmentos para assim propiciar uma melhor digestão enzimática. Para retirar o conservante residual, após a fragmentação foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o mesmo foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos à 16.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o material foi incubado por 15 minutos em estufa à 37°C para completa evaporação do etanol. Em seguida foi realizado o processo descrito no item 4.2.4.

O fragmento de tecido não utilizado foi armazenado em freezer -80°C.

4.2.3. Preparo do tecido emblocado em parafina

Com o auxílio de um micrótomo foram realizados de três a cinco cortes do tecido parafinado com espessura de 10 µM cada (aproximadamente 25 mg de tecido) e acondicionados em tubo cônico de 1,5 mL.

Para a remoção da parafina, foi adicionado 1 mL de Xilol aos cortes, após homogeneização e incubação por 30 minutos em banho-seco à 56°C, o material foi novamente homogeneizado e centrifugado por 5 minutos à 16.000

rpm. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento foi realizado mais uma vez. Para a desidratação do material, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o mesmo foi homogeneizado e submetido a centrifugação por 5 minutos à 16.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o material foi incubado por 15 minutos em estufa a 37°C para a evaporação do etanol. Em seguida foi realizado o processo descrito no item 4.2.4.

4.2.4. Isolamento e quantificação do DNA

O isolamento e purificação do DNA de tecido parafinado ou conservado em formol foi realizado de acordo com o protocolo do *kit* comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, UK).

Para a digestão das amostras, foi adicionado aos cortes 180 µL do *buffer* ATL e 20 µL de proteinase K, o material foi incubado no banho-seco a 56°C por 24 horas. Após este período, para promover o término da lise, foi adicionado ao material 200 µL do *buffer* AL, homogeneizando e incubando a 56°C por 10 minutos. Após este passo, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto e o material foi homogeneizado e transferido para uma coluna de purificação.

Após centrifugação por 2 minutos a 11.000 rpm, deu-se início as etapas de lavagem e eluição, realizando-se a primeira lavagem com a adição de 500 µL do *buffer* AW1 e centrifugação por 3 minutos a 14.000 rpm. À segunda lavagem, foi adicionado 500 µL do *buffer* AW2 e a coluna foi centrifugada por 5 minutos a 16.000 rpm.

Após as lavagens, a coluna foi transferida para um tubo cônico de 1,5 mL e a eluição foi realizada com 40 µL do *buffer* AE (adicionado no centro da coluna). Aguardou-se 5 minutos para sua completa absorção e o mesmo foi centrifugado por 5 minutos a 16.000 rpm.

Após o término do trabalho as amostras foram conservadas em *freezer* - 80°C.

4.2.5. Análise da qualidade da amostra

O DNA recém extraído foi avaliado quanto a sua concentração (em ng/µL)

e pureza (razões A260/A280 e A260/A230) por espectrofotometria (*Nanovue Plus-Nanovue Spectrophotometria, GE Life Science*) e submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 2% com padrão de peso molecular para verificar a integridade da amostra.

4.2.6. Técnicas de Triagem Genômica

4.2.6.1. Técnica de MLPA

A técnica de MLPA permite a quantificação relativa do número de cópias de aproximadamente 40 sequências do genoma em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em diversos genes (Stuppia et al., 2012; Willis et al., 2012).

O DNA selecionado para ser submetido à técnica de MLPA foi diluído a uma concentração de 70 ng/μL e 1 μL desta amostra foi adicionado em um microtubo cônico de 200 μL. O material foi colocado em um termociclador (*Veriti Thermal Cycler – Life Technologies*) para denaturação do DNA por 15 minutos a 98°C e, após este passo, foi realizado um *spin* nas amostras para sedimentação do DNA. Assim, foi adicionado ao DNA denaturado um *mix* de anelamento contendo sondas específicas e solução tampão. A etapa de hibridação ocorreu por 3 horas a 60°C.

Ainda com os tubos no equipamento, foi adicionado o *mix* de ligação contendo a enzima ligase para o processo de ligação entre as sondas do *kit*. Este processo foi realizado a 54°C por 15 minutos. Após a ligação das sondas, o processo de amplificação dos fragmentos anelados foi realizado utilizando-se a enzima *Taq Polimerase* e o *mix* da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por 1 hora e 30 minutos.

O produto da PCR foi colocado em microplaca com marcador de peso molecular (LIZ – GS500) e formamida HiDi (*Life Technologies*) e os fragmentos foram sequenciados automaticamente no equipamento ABI 3500 (*Life Technologies*).

Para o estudo foi utilizado o *kit* comercial SALSA MLPA P095 *Aneuploidy probemix* (MRC-Holland - Amsterdam, The Netherlands) que contempla 36

regiões cromossômicas, sendo oito para cada um dos cromossomos 13, 18, 21, X e quatro para o Y. A complementação da investigação citogenômica foi realizada utilizando-se os *kits* SALSA MLPA P070 *Human Telomere-5 probemix* (Regiões subteloméricas) e SALSA MLPA P064 *Mental Retardation-1 probemix* (Síndromes de Microdeleções) quando houve indicação clínica sugestiva de alterações subteloméricas ou de síndromes de microdeleções.

A escolha da conduta diagnóstica foi realizada de acordo com os laudos da necropsia e avaliação do caso pelo médico geneticista. Desta forma, os casos foram direcionados para investigação de aneuploidias, microdeleções/microduplicações e regiões subteloméricas.

As corridas de MLPA foram realizadas tecido-específica, utilizando controles negativos em cada experimento. Todas as amostras foram submetidas a duas corridas independentes para confirmação dos resultados.

As regiões contempladas em cada *kit* utilizado no presente trabalho estão apresentadas nos anexos A, B, C e D.

4.2.6.1.1. Análise dos Resultados de MLPA

Os dados foram gerados por sequenciador automático ABI 3500 da (*Life Technologies*), utilizando a Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM) do parque de equipamentos do HC-FMUSP.

A análise dos resultados da reação de MLPA foi realizada utilizando os programas *GeneMarker* (*Softgenetics, LLC, State College, PA* - www.softgenetics.com) e *Coffalyser.Net*. (www.mlpa.com.br), conforme recomendações do fabricante.

4.2.6.2. Técnica de Marcadores de Microssatélite (MMS)

As amostras de DNA selecionadas para avaliação pela técnica de MMS foram amplificadas usando o kit *Minifiler*™ (*AppliedBiosystems*) de acordo com as instruções do fabricante, em um termociclador 9700 com bloco de prata. Os produtos amplificados foram separados pelo sequenciador ABI 3130 (*AppliedBiosystems*) e a análise de perfis de DNA foi realizada utilizando o

GeneMapper™ ID versão 3.2 (*AppliedBiosystems*) de acordo com painéis e protocolos fornecidos pela *AppliedBiosystems*.

Para o estudo foi utilizado o *kit MiniFiler*™ (*AppliedBiosystems*), composto por 9 marcadores de *Short Tandem Repeats* (STRs) (D13S317, D7S820, Amelogenin, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, e FGA) que contemplam regiões dos cromossomos mais frequentemente viáveis (compatíveis com a vida) relacionados às principais aneuploidias Trissomia 21, Trissomia 18, Trissomia 13 e Monossomia X).

Esta técnica foi realizada em colaboração com o Departamento de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A técnica de MMS foi utilizada como método alternativo às amostras prejudicadas quanto a sua integridade nos casos de suspeita de aneuploidia completa com resultados inconsistentes à técnica de MLPA.

4.2.7. Técnicas auxiliares e confirmatórias

4.2.7.1. Real Time PCR (qPCR)

A técnica de qPCR foi utilizada com a finalidade de triar e eleger as amostras que seriam submetidas à técnica de *array*. Para isso, foi utilizado o *kit Infinium HD FFPE QC* (*Illumina*, San Diego, CA) de acordo com especificações do fabricante.

Primeiramente diluiu-se a amostra controle na proporção 1:10 em água destilada. Em seguida, a amostra de DNA do paciente foi diluída a concentração de 1 ng/μL. O controle, a amostra e o branco (água) foram pipetados em triplicatas, uma alíquota em cada poço da placa de qPCR. O *pré-mix* com *Sybgreen* foi preparado e adicionado em cada poço de amostra, controle e branco no volume de 16 μL. A placa foi selada com adesivo próprio, submetida à centrifugação a 280 x g e em seguida foi colocada no equipamento *Step One Plus – Applied Biosystems* (*Life Technologies*) para a efetivação da reação.

Os resultados foram obtidos em gráficos e planilhas, sendo avaliados e consideradas elegíveis ao *array* as amostras com delta (Δ CT) inferior a 5

(relação entre o ciclo de amplificação da amostra – ciclo de amplificação do controle).

4.2.7.2. Técnica de triagem genômica por *array*

A técnica de *array* pode avaliar o genoma completo em ensaio único sendo mais acurada que as técnicas de MLPA e MMS. O *BeadChip Infinium CytoSNP-850K* é um painel eficiente para análise das variações genéticas e estruturais relevantes para detecção de doenças genômicas. Ele oferece uma boa resolução e baixo ruído para medidas de número de cópias e processa 8 amostras simultaneamente, sendo capaz de identificar SNPs, CNVs, microalterações, aneuploidias e mosaicismos.

Para a realização dos experimentos de *array*, foi utilizada a plataforma *Illumina iScan (Illumina)* com o *BeadChip Infinium CytoSNP-850K*, seguindo o protocolo e instruções do fabricante.

Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA por amostra tecidual e a análise dos resultados foi realizada com o *software BlueFuse Multi*.

4.2.7.3. FISH em tecido parafinado

4.2.7.3.1. FISH em células obtidas por dissociação tecidual

A técnica de FISH em tecido parafinado foi realizada de acordo com protocolo interno do LC-LIM03-FMUSP. Três cortes histológicos de 10 µm cada foram colocados em um tubo cônico de 1,5 mL. Adicionou-se 1,0 mL de xilol em temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se este passo mais duas vezes.

Após a desparafinização, foi promovida a reidratação progressiva dos cortes em etanol 100%, 80%, 70%, 40% e água deionizada, cada um por 5 minutos e sempre centrifugados por 1 minuto a 2000 rpm. Após este passo, promoveu-se a digestão tecidual (dissociação do tecido) com proteinase K na concentração de 0,5 mg/mL no volume de 1,5 mL por 30 minutos a 45°C.

Após a digestão, o produto foi filtrado e o produto centrifugado por 10

minutos a 2000 rpm. O *pellet* celular foi lavado com PBS 1X por duas vezes, sempre centrifugando por 1 minuto a 2000 rpm.

Ao sedimento foi adicionado fixador na proporção 3:1 (metanol:ácido acético) e o mesmo foi lavado por 3 vezes. Entre as lavagens procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. Assim, a suspensão celular foi pingada na lâmina e a técnica de hibridação foi realizada.

Primeiramente desidratou-se a lâmina em etanol 80% em freezer -20°C por 5 minutos e em seguida em etanol 100% a temperatura ambiente. A lâmina foi aquecida a 37°C por 10 minutos e 5 µL da sonda foi adicionada ao material. Cobriu-se a lâmina com uma lamínula e denaturou-se o DNA em placa aquecedora por 10 minutos a 90°C. Em seguida a lâmina foi colocada em câmara úmida a 37°C para hibridação por no mínimo 8 horas.

Após esse período, a lamínula foi removida e a lâmina foi lavada em banhos de 0,4 x SSC 0,3% de *Tween* 20 por 2 minutos a 72°C; em banho de 2 x SSC 0,4% de *Tween* 20 por 2 minutos a temperatura ambiente; em banho de 2 x SSC a temperatura ambiente por 2 minutos; e em banho de 4 x SSC por 2 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, a lâmina foi contracorada com DAPI, adicionou-se a lamínula, aguardou-se 10 minutos para a leitura da lâmina sob microscopia de epi-fluorescência.

4.2.7.3.2. FISH em corte histológico

Foi realizado corte histológico de 4 µm em lâmina com atração positiva tecidual (com carga iônica). A lâmina foi mantida em estufa a 80°C durante 12 horas e em seguida submetida a 4 banhos de xilol P.A. por 15 minutos cada e em 3 banhos de etanol P.A. por 15 minutos cada. Após esta etapa, a lâmina foi colocada em banho de NaSCN 1 N (tiocianato de sódio) à 80°C por 12 minutos, deixando o excesso líquido escorrer em papel e a lâmina foi colocada em água destilada sob temperatura ambiente por 3 minutos.

Desta forma, a lâmina foi transferida para um borel contendo pepsina em HCl 0,1N a 37°C por 13 minutos e sequencialmente lavada em borel com água destilada T.A. por 3 minutos. Após, a sequência de desidratação em Etanol P.A. 70%, 85% e 100% por 2 minutos em cada foi iniciada e a sonda foi

aplicada (5 µl) sobre a lâmina na região delimitada para o estudo. Cobriu-se a lâmina com uma lamínula e selou-se com cola de borracha. A lâmina foi colocada em uma placa aquecedora à 80°C por 10 minutos e incubada (protegida da luz) em câmara úmida durante no mínimo 8 horas à 37°C.

Após esta etapa, a cola foi removida e a lâmina foi lavada em solução de lavagem T.A. de 2xSSC + 0,3% IGEPAL por 5 minutos e em solução de lavagem 74°C de 2xSSC + 0,3% IGEPAL por 2 minutos. Em seguida, a lâmina foi seca a T.A. em local escuro e contra-corada com 10 µl de DAPI. Colocou-se uma lamínula sobre a lâmina e esperou-se a revelação do DAPI por aproximadamente 10 minutos em geladeira. Após a finalização, a lâmina foi analisada sob microscopia de epi-fluorescência.

4.2.7.4. Sequenciamento pelo método de Sanger - Éxon 7 do gene *FGFR3*

Para os casos de suspeita de Displasia Tanatofórica tipo I, foram investigadas as alterações mais comuns (p.R248C e p.S249C) localizadas no éxon 7 do gene *FGFR3* por meio do sequenciamento bidirecional por Sanger.

O teste foi realizado em colaboração com o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O DNA foi amplificado conforme protocolo padrão do laboratório e o produto da PCR foi avaliado em gel de agarose a 2%. Após a etapa de checagem, o produto da PCR foi purificado com Exo/Sap e submetido à reação de sequenciamento capilar por Sanger.

O resultado foi analisado utilizando o *software* *Sequencher* 5.3 e o banco de dados *Mutation Taster*.

4.2.8. Fluxograma de Trabalho

As amostras de DNA obtidas dos tecidos processados foram submetidas aos testes citogenômicos de acordo com o fluxograma 2.

As amostras foram inicialmente triadas pela técnica de MLPA com a utilização dos *kits* P095, P064 e P070 conforme análise do laudo da necropsia e de acordo com a hipótese diagnóstica ou suspeita clínica.

Os casos normais ou alterados, com resultado conclusivo foram finalizados e os laudos foram liberados para a complementação do relatório anatomopatológico, conforme modelo anexo E.

Os casos com resultados inconclusivos foram submetidos a metodologias complementares.

Fluxograma 2 – Fluxo para investigação citogenômica.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Dos 30 pacientes avaliados, 13 apresentaram alteração no número de cópias gênicas/regiões cromossômicas consideradas patogênicas ou relevantes para o fenótipo. Dos 13 pacientes com resultado alterado, oito apresentaram alterações classificadas como aneuploidias, envolvendo os cromossomos 13, 18, 21, X e Y; quatro pacientes apresentaram microdeleções ou microduplicações de diferentes regiões genômicas, envolvendo os genes *TYMS*, *CHL1*, *HIC1*, *TOM1L2* e um paciente apresentou mutação de ponto patogênica no éxon 7 do gene *FGFR3*. Dois pacientes apresentaram doenças do desenvolvimento sexual com resultado normal pelas técnicas de MLPA e MMS e, por fim, 15 pacientes não apresentaram alterações genômicas detectadas com as técnicas utilizadas no estudo.

A figura 2 mostra uma visão geral dos resultados do presente trabalho.

Figura 2 – Visão geral dos resultados da investigação citogenômica.

As médias dos resultados das quantificações das amostras analisadas e as razões de pureza, de acordo com o conservante utilizado, encontram-se discriminadas no anexo F. A análise das concentrações e razões das amostras de DNA apresentaram-se adequadas para a realização dos testes de MLPA e MMS, uma vez que a quantidade exigida é de cerca de 70 ng/μL para a MLPA e de 10 ng/μL para a MMS.

Os anexos G e H evidenciam o grau de integridade das amostras, de acordo com o tipo de conservante utilizado para o DNA. O anexo G apresenta uma corrida eletroforética de amostras de DNA de tecidos conservados em RNA *later* e o anexo H a imagem das amostras conservadas em formol e parafina. Um total de 88 amostras foram consideradas adequadas e utilizadas para análise citogenômica.

A tabela 1 mostra em detalhes os resultados do estudo, evidenciando os tipos de MCs encontrados nos pacientes, o resultado prévio do cariótipo, a técnica citogenômica utilizada, o meio de conservação e os tecidos investigados.

Tabela 1 - Detalhes da análise citogenômica em 30 casos analisados.

Paciente	Tipo de Malformação Congênita	Cariótipo prévio	Técnica/Kit	Tecidos	Conservante	Resultados
1	MGU; ME	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P	FFPE	rsa 18p11.32(TYMS)X3 - feminino
			MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F	Formol	rsa(21)x3 - masculino
			Array (CytoSNP 850K)	CO	Formol	arr(21)x2 - masculino
2	MC, MGU	-	FISH (cent 13/21)	CO	FFPE	nuc ish(D21Z1x3)[4]/nuc ish (D21Z1x2)[26] - masculino
			FISH (EWSR1/ERG)	P	FFPE	nuc ish(ERGx3)[38]/nuc ish (ERGx1)[21]/nuc ish (ERGx2)[241] - masculino
			FISH (EWSR1/ERG)	F	FFPE	nuc ish(ERGx3)[81]/nuc ish (ERGx1)[26]/nuc ish (ERGx2)[193] - masculino
			FISH (EWSR1/ERG)	CO	FFPE	nuc ish(ERGx3)[134]/nuc ish (ERGx1)[38]/nuc ish (ERGx2)[128] - masculino
3	ME; Hidrocefalia	46,XY	MLPA (P070) kit B2	F	Formol	rsa 3p26.3(CHL1)X1 - masculino
			MLPA (P095) – kit A2/A3	P/ F/CE	RNA later	Sem alteração - masculino
4	Hérnia Diafragmática MC; MGU	-	MLPA (P064) – kit B2/B3	P/CE	RNA later	rsa 17p13.3(HIC1)X1 - masculino
			MLPA (P070) kit B2	F/CE	RNA later	Sem alteração - masculino
			MLPA (P064) – kit C1	P/CE	RNA later	Sem alteração - masculino
5	Gastrosquise	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/D	RNA later	Sem alteração - masculino
6	MC; Higroma Cístico	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P	RNA later	Sem alteração - feminino
7	MMC	47,XX,+18	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F/CE/D	RNA later	rsa(18)x3 – feminino
8	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	CO/D	RNA later	Sem alteração – feminino
9	MGU	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/CE	RNA later	Sem alteração - masculino
10	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
			MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
11	MMC	46,XY	MLPA (P064) – kit B2/B3	P/CO/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
			MLPA (P070) kit B2	P/CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
12	MMC	46,XY	MLPA (P095) – kit A2/A3	CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
13	MC; Asplenia congênita	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F/CE/D	RNA later	rsa(21)x3 - masculino
			MLPA (P064) – kit B2/B3	CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
14	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - masculino
15	MMC	46,XX,der(22) t(7;22)(q11.23;p11.2)	MLPA (P095) – kit A2/A3	P/CO/F/CE/D	RNA later	Sem alteração - feminino
			MLPA (P064) – kit B2/B3	P/CO/F/CE	RNA later	Sem alteração – feminino
16	MC	47,XX,+13	MMS (MiniFiler)	F/D	Formol	rsa (D13S317)x3 - feminino
			MLPA (P095) – kit A2/A3	F	FFPE	Presença de material de Y
17	MMC	45,X	MMS (MiniFiler)	F	FFPE	Alelos de X e Y
			FISH (cent X/Y)	F	FFPE	nuc ish(DXZ1x1)[391]/(DXZ1x2)[3]/(DXZ1,DYZ3)x1)[6]
			FISH (cent X/Y)	CE	FFPE	nuc ish(DXZ1x1)[15]/(DXZ1,DYZ3)x1)[2]
18	MMC	47,XX,+18	MLPA (P095) – kit A2/A3	P	RNA later	rsa(18)x3 – feminino
19	Genitália ambigua	-	MMS (Minifiler)	P/F/D	Formol	Sem alteração – feminino

Paciente	Tipo de Malformação Congênita	Cariótipo prévio	Técnica/Kit	Tecidos	Conservante	Resultados
20	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	D	Formol	rsa(18)x3 - feminino
			MMS (Minifiler)	P	Formol	rsa (D18S51)x3 - feminino
21	MMC	-	MMS (Minifiler)	P/F/PULMÃO	Formol	Sem alteração – masculino
22	Holoprosencefalia/MC	46,XY	MMS (Minifiler)	D/F/P	Formol	Sem alteração – masculino
23	MMC	-	MMS (Minifiler)	D/P	Formol	Sem alteração – masculino
24	MMC	-	MMS (Minifiler)	D/P	Formol	Sem alteração – feminino *
25	MMC	-	MMS (Minifiler)	D/P	Formol	Sem alteração – feminino *
26	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	F/D/CE	RNA later	Sem alteração – masculino
27	MMC	-	MLPA (P095) – kit A2/A3	F/D/CE/CO	RNA later	Sem alteração – masculino
			MLPA (P064) – kit C1	CO/CE/P/D	RNA later	Sem alteração – masculino
28	MMC	46,XX	MLPA (P095) – kit A2/A3	CE	RNA later	Sem alteração – feminino
			MLPA (P064) – kit C1	CE/P	RNA later	rsa 17p11.2(TOM1L2)X1 - feminino
29	MMC	47,XX,+18	MLPA (P095) – kit A2/A3	F/D	RNA later	rsa(18)x3 – feminino
30	MFE	-	Seq. Sanger	F	RNA later	c.746C>G – feminino

P = Pele / D = Diafragma / CE = Cérebro / CO = Coração / F = Fígado. FFPE = Parafina

ME = Malformação Esquelética; MC = Malformação cardíaca; MGU = Malformação Geniturinária; MMC = Múltiplas Malformações Congênitas.

* Gêmeos monozigóticos identificados pela técnica de MMS.

5.1. Análise Citogenômica

As análises dos resultados foram organizadas em seis grupos: Aneuploidias; Microdeleções e Microduplicações; Mutação de ponto; Outras anormalidades; Amostras sem alterações; Amostras controles.

5.1.1. Aneuploidias

Oito pacientes avaliados no trabalho apresentaram resultados compatíveis com aneuploidias, sendo dois casos de trissomia 21, quatro com trissomia 18, um com trissomia 13 e um paciente com aneuploidia envolvendo os cromossomos sexuais X e Y abaixo descritos:

Paciente 2

Recém-nascido do sexo masculino, com morte neonatal (27 horas de vida), apresentou múltiplas MCs, dentre elas anomalias cardíacas (comunicação interatrial) e renais (displasia renal e hidronefrose bilateral), hipoplasia pulmonar, anomalias craniofaciais como fâcies achatada, epicanto bilateral, orelhas de baixa implantação e posteriorizadas, nariz achatado com ponte nasal deprimida, micrognatia, língua protrusa, pregas palmares superficiais, intervalo aumentado entre o 1º e o 2º pododáctilos direito com sulco halucal, pé esquerdo torto com sobreposição do 2º ao 1º pododáctilo.

Foram encaminhados ao laboratório fragmentos de três tecidos (coração, fígado e pele) conservados em formol e o estudo pela técnica de MLPA com o *kit* P095 foi realizado para os três tecidos biopsiados, revelando trissomia do cromossomo 21 para os três tecidos investigados.

A figura 3 mostra o fenótipo do paciente e a figura 4 apresenta os resultados para o teste de MLPA para os três tecidos analisados.

Figura 3 – Sinais fenotípicos do paciente.

Figura 4 – (a) A MLPA com o *kit* P095 revelou duplicação dos genes *HSPA13* em 21q11.2, *USP25* em 21q21.1, *NCAM2* em 21q21.1, *APP* em 21q21.3, *TIAM1* em 21q22.11, *SOD1* em 21q22.11, *SIM2* em 21q22.13 e *TFF1* em 21q22.3 no fígado; (b) no coração a presença de regiões duplicadas e normais para as sondas do cromossomo 21 e (c) na pele uma das sondas (*TFF1* em 21q22.3) se encontra no limiar (*cut-off*) da corrida, sendo considerada normal no experimento. As setas evidenciam as sondas de 21q duplicadas no experimento.

A MLPA com o *kit* P095 revelou duplicação dos genes *HSPA13* em 21q11.2, *USP25* em 21q21.1, *NCAM2* em 21q21.1, *APP* em 21q21.3, *TIAM1* em 21q22.11, *SOD1* em 21q22.11, *SIM2* em 21q22.13 e *TFF1* em 21q22.3 no DNA do fígado; no DNA da pele, uma das sondas (*TFF1* em 21q22.3) se encontra no limiar (*cut-off*) da corrida, e no DNA do tecido cardíaco a presença de regiões duplicadas e normais para as sondas do cromossomo 21.

Para complementar a investigação, foi realizada a técnica de MMS para os três tecidos analisados, evidenciando tri-alelia para pele e fígado, com resultado inconclusivo para coração, conforme mostra a figura 5.

Figura 5 – (a) Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS no coração revelando a presença de apenas um alelo para o cromossomo 21, possivelmente em homozigose; (b) no fígado, a visualização de 2 alelos etiquetados de maneira desbalanceada sugerindo tri-alelia do cromossomo 21; (c) na pele, a evidência da tri-alelia para o cromossomo 21.

Os resultados da análise de DNA pelas duas técnicas foram parcialmente inconclusivos quanto ao perfil genômico dos tecidos analisados para os marcadores do cromossomo 21, sugerindo a presença de mosaicismos inter e intratecidual.

Para melhor compreensão das CNVs do paciente envolvendo o cromossomo 21, a amostra do DNA do coração foi submetida à técnica de *array*, revelando a presença de número de cópias gênicas normais para os cromossomos 21 (figura 6). Esta amostra foi previamente triada pela técnica de qPCR, apresentando ΔCT de 3,932, sendo elegível para a técnica de *array*.

A amostra foi submetida à técnica de *array* utilizando o *BeadChip Infinium CytoSNP-850K*, revelando duas cópias para o cromossomo 21, conforme ilustrado na figura 6.

Figura 6 – Resultado do teste de *array* para o cromossomo 21 - arr(21)x2.

Desta forma, para validação dos resultados, foi realizada a técnica de FISH utilizando sonda centromérica para o cromossomo 21 (LPE 13/21 - *Cytocell Technologies, Cambridge*) em tecido cardíaco que demonstrou a presença de mosaicismos intratecidual com a presença de células trissômicas e dissômicas (nuc ish(D21Z1x3)[4]/nuc ish (D21Z1x2)[26]), conforme ilustrado na figura 7.

Complementando esta análise, cortes histológicos dos três tecidos emblocados em parafina foram submetidos à FISH com sonda EWSR1/ERG *Translocation, Dual Fusion* (LPS 008 – *Cytocell Technologies, Cambridge*) confirmando o mosaicismo com três linhagens cromossômicas diferentes envolvendo o cromossomo 21, conforme porcentagens celulares destacadas na tabela 2. Algumas imagens da FISH estão apresentadas na figura 8 e abaixo segue os resultados da análise:

- ✓ Pele: nuc ish(ERGx3)[38]/nuc ish (ERGx1)[21]/nuc ish (ERGx2)[241];
- ✓ Fígado: nuc ish(ERGx3)[81]/nuc ish (ERGx1)[26]/nuc ish (ERGx2)[193];
- ✓ Coração: nuc ish(ERGx3)[134]/nuc ish (ERGx1)[38]/nuc ish (ERGx2)[128].

Figura 7 – Imagens da FISH utilizando sonda LPE 13/21 - *Cytocell Technologies, Cambridge* – mostrando mosaïcismo intratecidual - (a) células dissômicas para o 21 e (b) células com trissomia 21 em células cardíacas. As setas indicam os sinais presentes para os centrômeros dos cromossomos 13/21.

Figura 8 – Imagens da FISH realizada em cortes histológicos utilizando sonda *EWSR1/ERG Translocation, Dual Fusion LPS 008* – *Cytocell* – mostrando mosaïcismo intratecidual - (a) células trissômicas para o cromossomo 21 em fígado, (b) células monossômicas para o cromossomo 21 em pele e (c) células dissômicas para o cromossomo 21 em fígado. As setas indicam a hibridação no gene *ERG* em 21q22.2.

Tabela 2 – Porcentagem populacional das células encontradas pela FISH nos três tecidos avaliados com a utilização da sonda EWSR1/ERG *Translocation, Dual Fusion LPS 008 – Cytocell*.

Tecido (300 céls. analisadas)	Monossomia 21	Trissomia 21	Dissomia 21
Pele	7%	13%	80%
Fígado	9%	27%	64%
Coração	13%	44%	43%

Paciente 13

Recém-nascido do sexo masculino com morte neonatal (5 horas e meia de vida), apresentou cardiopatia congênita complexa caracterizada por displasia de valvas cardíacas, comunicação interatrial na fossa oval (tipo fossa oval fenestrada), persistência do canal arterial (PCA) e asplenia congênita.

Foram encaminhados ao laboratório fragmentos de cinco tecidos (cérebro, coração, fígado, pele e diafragma) conservados em RNA *later* e o estudo pela técnica de MLPA foi realizado utilizando o *kit* P095 para os cinco tecidos biopsiados. A figura 9 apresenta os sinais fenotípicos do paciente e como exemplo o resultado para a MLPA do DNA do cérebro.

Figura 9 – (a) Sinais fenotípicos do paciente. (b) A MLPA com o *kit* P095 revelou duplicação dos genes *HSPA13* em 21q11.2, *USP25* em 21q21.1, *NCAM2* em 21q21.1, *APP* em 21q21.3, *TIAM1* em 21q22.11, *SOD1* em 21q22.11, *SIM2* em 21q22.13 e *TFF1* em 21q22.3 nos cinco tecidos avaliados, sendo a imagem apresentada referente a análise do DNA do cérebro. A seta evidencia as sondas de 21q duplicadas no experimento.

O paciente 13 era portador de malformação cardíaca grave sem diagnóstico genético prévio. Foi utilizado o *kit* P095 para a investigação, que mostrou a presença de duplicação das sondas *HSPA13*, *USP25*, *NCAM2*, *APP*, *TIAM1*, *SOD1*, *SIM2* e *TFF1* em 21q em todos os tecidos avaliados, confirmando a trissomia do cromossomo 21. A investigação com o *kit* P064 não detectou alterações genômicas no paciente 13.

Paciente 7

RN do sexo feminino, com resultado prévio de cariótipo de sangue periférico com resultado 47,XX,+18, apresentava alterações fenotípicas como hipotelorismo, ponte nasal baixa e ápice nasal elevado, abertura bucal estreita, microtia, conduto auditivo externo imperfurado à esquerda, apêndice auricular à direita, pescoço curto, braquidactilia, sobreposição de 2º e 3º quirodáctilos, comunicação interventricular cardíaca, hipertrofia de ventrículo direito, displasia renal multicística à direita, hipertrofia compensatória do rim esquerdo e baço acessório.

Faleceu com 4 meses e 10 dias de vida. Amostras de DNA de cérebro, fígado, diafragma, pele e coração desse paciente foram submetidos a técnica de MLPA utilizando o *kit* P095 que revelou trissomia do cromossomo 18. A figura 10 mostra alguns sinais fenotípicos do paciente e o resultado da MLPA com as sondas duplicadas em 18p e 18q, analisadas pelo Software *Coffalyser*.

Figura 10 – (a) Sinais fenotípicos do paciente. (b) A MLPA com *kit* P095 revelou duplicação para os genes *MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23, sendo a imagem apresentada referente a análise da amostra de DNA do fígado.

A MLPA revelou duplicação para os 8 genes (*MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23) para o cromossomo 18 contemplados no *Kit* P095 nos 5 tecidos avaliados.

Paciente 18

NM do sexo feminino, com cariótipo de líquido amniótico 47,XX,+18, apresentou à necropsia fácies triangular com orelhas displásicas, hirsutismo e hipertricose, mãos cerradas e hálux encurtado e em dorso flexão. Ainda, portador de comunicação interventricular e hérnia diafragmática.

Amostra de pele foi submetida à análise citogenômica pela técnica de MLPA com o *kit* P095 revelando duplicação para as 8 sondas para o cromossomo 18. A figura 11 apresenta a imagem da análise.

Figura 11 – A MLPA com *kit* P095 revelou duplicação para os genes *MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23, sendo a imagem apresentada referente a análise do DNA da pele. A seta evidencia as sondas de 18p e 18q duplicadas no experimento.

A MLPA revelou duplicação para os 8 genes (*MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23) para o cromossomo 18 contemplados no *Kit* P095 no tecido avaliado.

Paciente 20

NM do sexo feminino, portador de múltiplas malformações de sistema cardíaco e renal. Durante o período pré-natal, foi colhido material para a realização do cariótipo fetal sem sucesso na cultura celular. Foi realizada a investigação citogenômica tecidual em DNA extraído da pele e de diafragma, revelando o resultado *rsa* (D18S51)x3 - tri-alelia do marcador para o cromossomo 18. A técnica de MLPA com o *kit* P095 revelou resultado de trissomia 18 para as 8 sondas da reação. A figura 12 mostra a imagem do paciente, os resultados de MMS realizado no DNA de pele e do MLPA para DNA do diafragma.

Figura 12 – (a) Foto do paciente. (b) Resultado do teste de MMS no DNA de pele revelando tri-alelia para o marcador D18S51 do cromossomo 18. (c) A MLPA com *kit* P095 revelou duplicação para os genes *MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23, sendo a imagem apresentada referente a análise do DNA do diafragma. A seta evidencia as sondas de 18p e 18q duplicadas no experimento.

A técnica de MMS revelou tri-alelia para o marcador D18S51 do cromossomo 18 em tecido epitelial e a MLPA mostrou a duplicação para as 8 sondas dos genes (*MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23) para o cromossomo 18 contemplados no *Kit* P095 no DNA extraído do diafragma.

Paciente 29

RN do sexo feminino, com diagnóstico pré-natal (cariotipagem de líquido amniótico) revelando resultado 47,XX,+18, com múltiplas MCs falecendo com 2 horas de vida. Na necropsia apresentou fenda lábio palatina à esquerda, ponte nasal baixa, pescoço curta, baixa implantação das orelhas, retrognatia, hipertelorismo mamário, sobreposição dos dedos das mãos, hisurtismo e pés em cadeira de balanço, malformação cardíaca, renal e agenesia parcial de corpo caloso. No relatório anatomopatológico, a gestação anterior apresentava monossomia X.

A análise citogenômica em DNA extraído de fígado e diafragma revelou a presença de 3 cópias gênicas para as 8 sondas do *kit* P095 para o cromossomo 18, confirmando o resultado do cariótipo fetal de trissomia 18. A figura 13 apresenta os sinais fenotípicos do paciente e o resultado da MLPA.

Figura 13 – (a) Sinais fenotípicos. (b) A MLPA com *kit* P095 revelou duplicação para os genes *MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23, sendo a imagem apresentada referente a análise do DNA do diafragma. A seta evidencia as sondas de 18p e 18q duplicadas no experimento.

A MLPA revelou duplicação para os 8 genes (*MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23) para o cromossomo 18 contemplados no *Kit* P095 nos dois tecidos avaliados.

Paciente 16

Recém-nascido do sexo feminino, com resultado de cariótipo 47,XX,+13 – Trissomia 13 (Síndrome de Patau), com morte neonatal (72 horas de vida). Nasceu com múltiplas MCs destacando-se cardiopatia (comunicação interventricular e atresia pulmonar), displasia renal bilateral, hipoplasia tímica, hipotonia, baixa implantação das orelhas, fenda palatina posterior, polidactilia e fácies característicos da Trissomia do 13.

Primeiramente as amostras de DNA foram submetidas à análise de MLPA com a utilização do *kit* P095. Os resultados foram inconclusivos e, considerando a baixa integridade da amostra de DNA em questão, o teste foi inviabilizado.

Assim, as amostras foram submetidas à técnica de MMS e, a análise do DNA dos fragmentos de diafragma e fígado evidenciaram a presença de três

alelos para o cromossomo 13. A figura 14 mostra os sinais fenotípicos do paciente e as figuras 15 e 16 apresentam os resultados.

Figura 14 – Sinais fenotípicos evidenciando a baixa implantação das orelhas, a polidactilia à esquerda e a face típica da Trissomia 13.

Figura 15 – Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS no DNA do fígado revelando a presença de trissomia do cromossomo 13. Nota-se que no marcador D13S317 (referência do cromossomo 13) foram etiquetados 3 picos no eletroferograma, correspondentes a 3 diferentes blocos de STRs.

Figura 16 – Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS no DNA do diafragma revelando a presença de trissomia do cromossomo 13. Nota-se que no marcador D13S317 (referência do cromossomo 13) foram etiquetados 3 picos no eletroferograma, correspondentes a 3 diferentes blocos de STRs.

A paciente avaliada possuía diagnóstico prévio de Trissomia do cromossomo 13 realizado pela técnica de cariotipagem por bandamento G em

sangue periférico. As Figuras 15 e 16 mostram os resultados da técnica de MMS nos dois tecidos avaliados, revelando a trissomia do cromossomo 13 (três picos presentes correspondentes aos blocos de STRs etiquetados). Para os demais marcadores avaliados (8 regiões de diferentes cromossomos), os resultados foram normais.

Paciente 17

Recém-nascido do sexo feminino com morte neonatal com 16 dias de vida, apresentou ao nascimento malformações, destacando-se principalmente a exoencefalocoele e ovário disgenético. Diante do quadro clínico da paciente, foi levantada a suspeita da Síndrome de Turner, sendo realizada a cariotipagem em sangue periférico sob bandamento G revelando a presença da Monossomia X (45,X).

Oliveira e colaboradores discutem que um segundo cromossomo sexual é necessário para a sobrevivência fetal, uma vez que aproximadamente 99% dos fetos com cariótipo 45,X resultam em abortos (Yousoufian et al., 2002; Oliveira et al., 2009).

Assim, foi investigada *post-mortem* a presença de alterações em outros tecidos desta paciente. Para isso, o DNA de tecido hepático emblocado em parafina foi analisado pela técnica de MLPA com o *kit* P095, evidenciando a presença de material de cromossomo Y na análise comparativa, conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17 – A MLPA com *kit* P095 revelou a presença de sondas para o cromossomo Y no paciente 17. A seta evidencia as sondas de Y presentes e deslocadas da linha 0 no experimento.

Esta corrida de MLPA foi analisada com controles feminino e masculino, de maneira independente, confirmando a presença de material do cromossomo Y. A figura 17 mostra o resultado comparativo com controle masculino, sendo que as sondas deste cromossomo deveriam estar deslocadas na linha 0 do gráfico, uma vez que a paciente é do sexo feminino. Assim, o deslocamento das sondas da linha 0 revela a presença de material do cromossomo Y no DNA desta paciente.

Após esta análise, o DNA da paciente foi submetido à técnica de MMS revelando a presença do marcador AMEL com alelos relativos aos cromossomos X e Y (figura 18).

Figura 18 – Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS em tecido hepático revelando a presença dos marcadores para os cromossomos X e Y. Nota-se que no marcador AMEL (referência do cromossomo X e Y) foi etiquetado em dois picos no eletroferograma.

Para confirmar os testes, foi realizada a técnica de FISH em cortes histológicos de tecido hepático e em células dissociadas do cérebro com sonda centromérica (LPE 0XYc - *Dual Labelled*).

A análise do fígado revelou o resultado nuc ish(DXZ1x1)[391]/(DXZ1x2)[3]/(DXZ1,DYZ3)x1[6], evidenciando a presença de três tipos celulares: células com dois sinais para o cromossomo X, células com um sinal para X e Y e células com apenas 1 sinal para X (figura 19). A análise em células do cérebro revelou a presença de células dissômicas para X e dissômicas X e Y, conforme apresentado na figura 20.

Figura 19 – Imagem da FISH utilizando sonda centromérica para X e Y. Em verde, destacam-se os sinais para o cromossomo X e em vermelho para o cromossomo Y, revelando no fígado a presença de células monossômicas para o cromossomo X, dissômicas (XX) e dissômicas (XY).

Figura 20 – Imagem da FISH utilizando sonda centromérica para X e Y. Em verde, destacam-se os sinais para o cromossomo X e em vermelho para o cromossomo Y, revelando no cérebro a presença de células monossômicas para o cromossomo X e dissômicas (XY). A seta mostra o sinal em verde (para o cromossomo X) na célula monossômica.

5.1.2. Microdeleções e microduplicações

Os pacientes com microduplicações e microdeleções apresentaram alterações em diferentes genes, sendo um paciente com duplicação do gene *TYMS* em 18p11.32, um paciente com deleção do gene *CHL1* em 3p26.3, um paciente com deleção do gene *HIC1* em 17p13.3 e um paciente com a deleção do gene *TOM1L2* em 17p11.2.

Paciente 1

Paciente do sexo feminino portador de malformação do trato geniturinário (agenesia renal direita e malformação renal esquerda), agenesia do primeiro quirodáctilo direito, sindactilia e deficiência intelectual, vindo a falecer com 3 anos e 11 meses. Amostra de DNA da pele emblocado em parafina foi submetido à técnica de MLPA utilizando-se o *kit* P095. O estudo revelou uma duplicação do gene *TYMS* em 18p11.32, conforme apresentado na figura 21.

Figura 21 - A MLPA com o kit P095 revelou duplicação do gene *TYMS* em 18p11.32 (na seta) na amostra de DNA da pele.

O teste de MLPA deste paciente foi repetido em duas corridas independentes, com controles diferentes, evidenciando o mesmo padrão de corrida, confirmando o resultado de duplicação do gene *TYMS*.

Paciente 3

Recém-nascido, sexo masculino, portador de hidrocefalia, malformações esqueléticas (suspeita de Displasia Tanatofórica tipo II), com cariótipo fetal 46,XY e morte neonatal com 23 horas de vida. Foi coletada amostra de tecido hepático para análise genômica e, utilizando-se a técnica de MLPA com o *kit* P070, encontrou-se a deleção do gene *CHL1* em 3p26.3. A figura 22 evidencia os sinais clínicos do paciente e o resultado citogenômico diagnosticado em tecido hepático.

Figura 22 - (a) Sinais fenotípicos do paciente. (b) A MLPA com o *kit* P070 revelou deleção do gene *CHL1* em 3p26.3 no tecido hepático.

A escolha do *kit* P070 não foi realizada ao acaso. Ele contempla as regiões subteloméricas de todos os cromossomos e, de acordo com a suspeita clínica evidenciada durante a necropsia, para a Displasia Tanatofórica, a alteração poderia estar no gene *FGFR3* que está localizado em 4p16.3. O *kit* contempla esta região cromossômica, entretanto, não avalia as mutações efetivamente no gene em questão. O diagnóstico de Displasia Tanatofórica é realizado por meio do sequenciamento do gene *FGFR3*, e, com a realização da técnica de MLPA pode-se verificar que a região cromossômica 4p16.3 não está deletada nem duplicada.

Paciente 4

RN do sexo masculino portador de MCs (Síndrome de coração esquerdo hipoplásico, hérnia diafragmática à direita e criptorquidia bilateral) evolui com parada cardiorrespiratória e foi declarado óbito com 4 horas de vida.

Foi encaminhado ao laboratório fragmentos de três tecidos (pele, fígado e cérebro) conservados em RNA *later* e, a investigação citogenômica foi conduzida revelando resultado normal para os *kits* P095 e P070, e utilizando-se o *kit* P064-B2/B3 foi detectada a deleção do gene *HIC1* em 17p13.3, conforme ilustrado na figura 23.

Figura 23 - A MLPA com o *kit* P064 revelou deleção do gene *HIC1* em 17p13.3 (na seta) na pele e no cérebro. A imagem é referente à análise do cérebro.

Paciente 28

NM do sexo feminino, com diagnóstico pré-natal de Malformação de Dandy Walker (por agenesia de vermis cerebelar e ventriculomegalia grave bilateral), cardiopatia fetal do tipo *truncus arterioso* tipo 3, agenesia de timo, hipertelorismo ocular e micrognatia. O paciente 28 apresentou cariótipo 46,XX realizado no diagnóstico pré-natal e número de cópias gênicas normal para o *kit* P095 em DNA de cérebro. Ainda, durante a necropsia, foi sugerida a suspeita de Síndrome Velo-Cardio-Facial (SVCF).

A hipótese diagnóstica para a SVCF, uma síndrome de genes contíguos causada pela microdeleção da região 22q11.2. Desta forma, a investigação foi conduzida coma a utilização da técnica de MLPA com o *kit* P064, revelando número de cópias gênicas normais para as sondas *CLTCL1*, *CDC45*, *GNB1L*, *DGCR8*, *ZNF74*, *MED15*, *SNAP29*, *ARSA* e *SHANK3* em 22q dos tecidos avaliados (cérebro e pele). Entretanto, a análise identificou a deleção do gene *TOM1L2* em 17p11.2, conforme ilustrado na figura 24 referente ao DNA do cérebro. Este gene está contido na Síndrome de Smith-Magenis, cujos sinais clínicos se sobrepõem à SVCF.

Figura 24 - A MLPA com o *kit* P064 revelou deleção do gene *TOM1L2* em 17p11.2 (na seta) na pele e no cérebro. A imagem é referente a análise do cérebro.

5.1.3. Mutação de ponto

Paciente 30

RN do sexo feminino, com ultrassom pré-natal evidenciando a presença de displasia tanatofórica letal tipo I. Portador de macrocrania, fronte proeminente, fontanelas amplas, ponte nasal achatada, tórax estreito e membros curtos, faleceu com 1 hora e 38 minutos de vida.

A necropsia revelou a presença de bossa parieto-occipital direita e frontal, com fontanelas amplas, hipertelorismo e ponte nasal deprimida, com desproporção cranio-facial. O tórax apresentou-se estreito, em formato de sino, encurtado, com abdômen proeminente. Os membros superiores eram proporcionalmente curtos e membros inferiores com fêmures arqueados. O cérebro com volume aumentado para idade cronológica, agenesia parcial do corpo caloso, ventrículos em "Asa de morcego" e lobos temporais rodados medialmente.

Durante a necropsia foi colhida amostra de tecido hepático para investigação citogenômica e, o DNA foi submetido à amplificação e sequenciamento da região do éxon 7 do gene *FGFR3* em 4p16.3, revelando uma mutação em heterozigose g.8535C>G (c.746C>G) - S249C, descrita na literatura como patogênica e compatível com o quadro de displasia tanatofórica letal tipo I. A figura 25 mostra os sinais fenotípicos do paciente e a figura 26 apresenta a mutação encontrada no gene.

Figura 25 – Sinais fenotípicos evidenciando a presença de encurtamento dos membros, sugestivo de Displasia Tanatofórica tipo I (DTI).

Figura 26 – Eletroferograma evidenciando a mutação g.8535C>G (c.746C>G) – S249C em heterozigose no tecido hepático do paciente 30, destacado em vermelho.

5.1.4. Outras anormalidades

Paciente 6

Feto do sexo masculino com higroma cístico e implantação baixa de orelhas com malformação cardíaca do tipo comunicação interatrial em forame oval. O estudo citogenômico em amostra de pele foi conduzido utilizando o *kit*

P095, revelando número de cópias gênicas normais para o sexo feminino, conforme ilustrado na figura 27.

Figura 27 – Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o *kit* P095 revelando número de cópias gênicas normais para o sexo feminino. A seta mostra a ausência de cópias gênicas do cromossomo Y na amostra.

O paciente em questão apresentava genitália externa compatível com o sexo masculino e resultado molecular com duas cópias para os genes do cromossomo X e nenhuma para o cromossomo Y.

Paciente 19

RN Pré-termo, 36 semanas, sexo indefinido (genitália ambígua), hipotônico, bradicárdico e cianótico, com múltiplas MC faleceu com 3 dias de vida, sem hipótese diagnóstica e sem diagnóstico genético prévio. Não houve crescimento celular adequado para a cariotipagem em banda G. Os sinais fenotípicos do paciente estão apresentados na figura 28.

A investigação citogenômica foi iniciada utilizando-se a técnica de MLPA com o *kit* P095 nas amostras do fígado, diafragma e pele, que apresentou resultados inconclusivos devido à degradação das amostras (colhida em formol). Assim, foram realizados os testes com o *kit* Minifiler, onde pode-se confirmar a presença de di-alelia para o cromossomo X e número de alelos normal para os demais cromossomos nos três tecidos, conforme ilustrado na figura 29.

Figura 28 – Sinais fenotípicos evidenciando a genitália ambígua do paciente 19.

Figura 29 – Resultado da investigação citogenômica pela técnica de MMS no DNA do fígado inferindo-se a presença do marcador para os cromossomos X. Nota-se que no marcador AMEL (referência do cromossomo X e Y) foi etiquetado apenas uma vez no eletroferograma, com parâmetros compatíveis com a dissomia do X.

5.1.5. Pacientes sem alterações

Quinze pacientes apresentaram resultados sem alterações para todos os tecidos avaliados por meio das técnicas de MLPA e/ou MMS: pacientes 5, 8 - 12, 14 e 15, 21 - 27.

5.1.6. Casos controles

Os quatro casos controles apresentaram resultados normais quando avaliados pelos testes de MLPA com os kits P095, P064 e P070 e pelo teste de MMS com o kit *Minifiler*, para os cinco tecidos investigados, conforme ilustrado nas figuras 30, 31, 32, 33 e 34.

Em todas as corridas de MLPA foram utilizados três controles normais para a análise comparativa.

Figura 30 – Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o kit P095 – A2/A3 - revelando número de cópias gênicas normais para pele.

	Probe Name	Bin Size	963-P064_D01
1	AR/OF	150.9	2
2	ASFA	262.3	2
3	CDGS	461.9	2
4	CLDN6	193.7	2
5	CLP2_1	227.7	2
6	CLP2_2	415.1	2
7	CLTCL1	188.5	2
8	ELN	308.2	2
9	FZD9	254.2	2
10	GABRB3	406.7	2
11	GNB1	174.4	2
12	HCL_1	181.0	2
13	HCL_2	351.3	2
14	JAG1_1	342.3	2
15	JAG1_2	469.9	2
16	KUHL22	450.7	2
17	LMK1	388.9	2
18	LLGL1	299.7	2
19	LRROR8	270.9	2
20	MESTL6	423.8	2
21	MFAR8	352.3	2
22	MFRN6	168.2	2
23	NDN	216.7	2
24	NEDL_ex05	138.1	2
25	NEDL_ex13	442.4	2
26	NEDL_ex18	207.8	2
27	FARAH1B1_1	235.0	2
28	FARAH1B1_2	280.6	2
29	FARF4	244.4	2
30	FRSAR2	326.7	2
31	SONRD	130.8	2
32	SK	433.0	2
33	SNAR9	369.9	2
34	SIXA	288.1	2
35	TNFRSF13B	162.5	2
36	TNFRSF18	379.5	2
37	TNFRSF4	125.6	2
38	THF3	333.6	2
39	TRPV1	144.4	2
40	TWIST1	317.5	2
41	TWIST9	199.6	2
42	UBASHA_ex07	155.8	2
43	UBASHA_ex13	386.4	2
44	X_100	99.5	5
45	Y_105	104.5	0
46	z_D089	85.6	5

Figura 31 – Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o *kit* P064 - B2/B3 - revelando número de cópias gênicas normais para pele.

	Probe Name	Bin Size	297 - P070_B02
1	Ctrl_01p06.3	303.3	2
2	Ctrl_01q44	128.2	2
3	Ctrl_02p25	311.3	2
4	Ctrl_03p7.2	135.0	2
5	Ctrl_03p36.1	320.1	2
6	Ctrl_03p29	140.9	2
7	Ctrl_04p16.3	327.3	2
8	Ctrl_04p36	148.2	2
9	Ctrl_05p15.33	335.3	2
10	Ctrl_05p36.3	155.8	2
11	Ctrl_06p25-p27	342.2	2
12	Ctrl_06p27	162.4	2
13	Ctrl_07p22.3	351.0	2
14	Ctrl_07p36.3	168.8	2
15	Ctrl_08p23	368.4	2
16	Ctrl_08p43	176.0	2
17	Ctrl_09p34.3	366.8	2
18	Ctrl_09p43	183.1	2
19	Ctrl_10p14	375.7	2
20	Ctrl_10p23.2-q	190.1	2
21	Ctrl_11p15.5	383.4	2
22	Ctrl_11p25	198.4	2
23	Ctrl_12p11	380.8	2
24	Ctrl_12p4.33	207.6	2
25	Ctrl_13q12.11	399.3	2
26	Ctrl_13q4	215.4	2
27	Ctrl_14q11.2-q	405.6	2
28	Ctrl_14q32.3	222.9	2
29	Ctrl_15q11.2-q	414.8	2
30	Ctrl_15p23	230.4	2
31	Ctrl_16p13.3	422.6	2
32	Ctrl_16p43	228.4	2
33	Ctrl_17p13.3	432.0	2
34	Ctrl_17q25	246.8	2
35	Ctrl_18p11.32	439.5	2
36	Ctrl_18q23	255.9	2
37	Ctrl_19p13	444.8	2
38	Ctrl_19q13.43	262.4	2
39	Ctrl_20p13-p16	453.9	2
40	Ctrl_20q13.33	270.2	2
41	Ctrl_21q11	461.7	2
42	Ctrl_21q22.3	277.7	2
43	Ctrl_22q11.1	474.3	2
44	Ctrl_22q13.33	287.4	2
45	S-OC	480.9	2
46	SYBL1	295.5	2

Figura 32 – Análise de CNVs pela técnica de MLPA com o *kit* P070 – B2 - revelando número de cópias gênicas normais para pele.

Figura 33 – Análise de STRs com o *kit Minifiler* com número de alelos normais para os marcadores do *kit* – sexo masculino – para pele.

Figura 34 – Análise de STRs com o *kit Minifiler* com número de alelos normais para os marcadores do *kit* – sexo feminino – para pele.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Aneuploidias

Sabe-se que as aneuploidias são responsáveis por grande parte dos quadros malformativos em neonatos vivos, sendo que a trissomia do cromossomo 21 é a aneuploidia mais comum, seguida da trissomia 18 e 13, respectivamente (Obu et al., 2012).

Na casuística apresentada foi verificado que as aneuploidias representaram cerca de 50% das alterações encontradas, sugerindo que a presença de aneuploidia, em qualquer tecido, e independente de se apresentar na forma de mosaico ou não, possa ser a causa da maior parte das mortes no período neonatal e/ou pós-natal. No entanto, como a investigação molecular ainda é insuficiente na maioria dos serviços, será necessário aumentar o número de pacientes investigados *post-mortem* para fundamentar essa conclusão.

Mesmo que as aneuploidias sejam subdiagnosticadas *in vivo*, e o óbito do paciente ocorra sem investigação molecular, como no caso do paciente 2 do estudo, a aplicação combinada das técnicas citogenômicas *post-mortem* pode mostrar a presença de aneuploidias.

Assim, para o paciente 2, que não foi submetido a nenhuma avaliação clínica ou laboratorial genética antes do falecimento, a técnica de MLPA evidenciou a alteração no número de cópias gênicas para o cromossomo 21 nos três tecidos avaliados, revelando perfis diferentes de distribuição de sondas duplicadas e normais.

De acordo com van Veghel-Plandsoen e colaboradores a técnica de MLPA é capaz de detectar níveis de mosaicismo de cerca de 40% da população celular em linfócitos de sangue periférico (van Veghel-Plandsoen et al., 2011).

Já a aplicação da técnica de MMS mostrou picos de di-alelia e tri-alelia para o marcador D21S11. Ambos os resultados, de MLPA e MMS, revelaram perfis de distribuição genômica sugestivos da presença de mosaicismo.

Complementando a análise da amostra do paciente 2 com a técnica de

FISH, foi encontrada a presença de três linhagens celulares diferentes, com proporções de baixa frequência para células trissômicas (13% para pele e 27% para fígado). A técnica de MLPA foi sensível para detectar esta população celular, sugerindo um potencial maior da sensibilidade desta técnica para investigação de mosaicismo do que relatado na literatura.

O mosaicismo envolvendo linhagem monossômica para o cromossomo 21 é um evento raro, com evolução precoce a óbito dos seus portadores, semelhante ao paciente 2. Toral-Lopez e colaboradores apresentaram um caso com monossomia 21 em mosaico com sinais clínicos que se sobrepõe ao fenótipo do paciente apresentado (Toral-Lopez et al., 2012).

A interpretação de mosaicismo pela técnica de MLPA ainda não é consenso na literatura, uma vez que são raros os trabalhos que demonstram a presença de desequilíbrios genômicos em diferentes tecidos (Halushka et al., 2005).

Leon e colaboradores relataram uma paciente, com grau de mosaicismo de aproximadamente 13% de células trissômicas para o cromossomo 21 em linfócitos de sangue periférico, detectado pela técnica de *array* (plataforma *Affymetrix*) (Leon et al., 2010). Inesperadamente o resultado da análise por *array* para o DNA do tecido cardíaco do paciente 2 revelou-se normal, o que poderia ser explicado pela presença do mosaicismo incluindo uma linhagem monossômica intratecidual.

Ainda, a variabilidade fenotípica vista no paciente 2 pode estar diretamente relacionada à presença concomitante de linhagens celulares alteradas e normais em diferentes tecidos, caracterizando a presença do mosaicismo somático pervasivo. O produto deste desequilíbrio gênico-celular pode perturbar o processo de desenvolvimento embrionário promovendo alterações clínicas atípicas e muito variáveis (Costa et al., 2015).

O paciente 13 apresentou trissomia para o cromossomo 21 nos cinco tecidos avaliados sendo consistente com a síndrome de Down. Em 2009, Lyle e colaboradores estudaram 19 indivíduos portadores da trissomia parcial do cromossomo 21, estreitando a relação genótipo-fenótipo nessa síndrome, e concluindo que uma região de 3,8 a 6,5 Mb em 21q, com cerca de 25-50 genes, é a responsável pela maioria das características clínicas da Síndrome

de Down (Tabela 3) (Lyle et al., 2009).

Tabela 3 - Relação entre as sondas de MLPA duplicadas, região genômica e fenótipo, segundo Lyle et al., 2009.

Sondas	Região Genômica	Características Fenotípicas
HSPA13	21q11.2	Orelhas pequenas e dismórficas
USP25	21q21.1	Orelhas pequenas e dismórficas
NCAM2	21q21.1	Orelhas pequenas e dismórficas
APP	21q21.3	Orelhas pequenas e dismórficas
TIAM1	21q22.11	Orelhas pequenas e dismórficas; malformações cardíacas
SOD1	21q22.11	Orelhas pequenas e dismórficas; malformações cardíacas
SIM2	21q22.13	Orelhas pequenas, dismórficas e mal posicionadas; boca entreaberta; intervalo aumentado entre o 1º e 2º pododáctilos; ponte nasal deprimida; epicanto; mãos curtas; língua sulcada; fâcies achatada; anomalias cardíacas; pregas palmares; hipotonia
TFF1	21q22.3	Orelhas mal posicionadas; fâcies achatadas; anomalias cardíacas

A investigação para alterações genômicas *post-mortem* no paciente 13, utilizando a MLPA, mostrou que todas as sondas para o cromossomo 21 estavam duplicadas. Desta forma, a investigação corrobora com a trissomia completa do cromossomo 21 e com os sinais fenotípicos compilados no trabalho de Lyle e colaboradores.

Ainda, considerando os resultados para o grupo das aneuploidias, foram determinados quatro pacientes com resultado trissômico para o cromossomo 18 (pacientes 7, 18, 20 e 29). A técnica de MLPA revelou duplicação para os genes *MC2R* em 18p11.21, *TYMS* em 18p11.32, *SS18* em 18q11.2 (duas regiões), *SMAD4* em 18q21.2, *PMAIP1* em 18q21.32, *SERPINB2* em 18q21.33 e *NFATC1* em 18q23 em todos os pacientes e tecidos analisados.

Enquanto que para a trissomia 21 existe uma região genômica já estabelecida e diretamente associada ao quadro clínico dos pacientes, para os portadores de trissomia 18, ou síndrome de Edwards, essa relação ainda não está clara na literatura. Na verdade, vários estudos com portadores da trissomia parcial do cromossomo 18 foram inconclusivos e inconsistentes na tentativa de se estabelecer uma região genômica crítica para a relação genótipo-fenótipo (Koide et al., 2011). Koide e colaboradores apresentaram um paciente com todos os sinais clínicos da síndrome de Edwards com uma

duplicação parcial do cromossomo 18 (18q21.1-qter); e, ao mesmo tempo, relataram dois pacientes sem o quadro característico da doença com duplicações maiores, em 18q12.3-qter e em 18q21.2-qter, respectivamente (Koide et al., 2011).

A elevada letalidade nessa síndrome também dificulta a investigação, sendo que a realização de um estudo citogenômico *post-mortem* pode contribuir para entender melhor a correlação genótipo-fenótipo nessa síndrome.

Para o paciente 16, que apresentava cariótipo prévio mostrando uma trissomia do cromossomo 13, a investigação citogenômica *post-mortem* utilizando MLPA com o *Kit* P095 ficou imprecisa, no entanto, os resultados obtidos por MMS foram conclusivos e totalmente concordantes com a análise cariotípica inicial por bandamento G, evidenciando que a técnica de MMS é uma alternativa metodológica viável para a aplicação nesse tipo de amostra.

A investigação citogenômica nas amostras obtidas da paciente 17, que apresentava disgenesia ovariana, mostrou um mosaicismismo intratecidual para o cromossomo X, e ao mesmo tempo, revelou a presença de sequências do cromossomo Y, confirmadas por diferentes técnicas.

A busca por regiões do cromossomo Y, em particular do gene *SRY*, em pacientes portadores de monossomia X, *in vivo*, já é um procedimento de rotina, sendo importante para esclarecer o diagnóstico e conduta clínica profilática, uma vez que quando confirmada a presença de material do cromossomo Y em linhagens celulares, existe a indicação da realização de gonadectomia devido ao risco de malignização das gônadas (Soares et al., 2008).

Esse achado em amostras *post-mortem*, no entanto, é extremamente raro na literatura, sendo ainda prematuro inferir a significância do mosaicismismo inter e intratecidual do cromossomo Y nas malformações sindrômicas que resultam em morte precoce (Filges et al, 2011).

6.2. Microdeleções e microduplicações

Recentemente foi estabelecida uma clara associação entre as CNVs e as manifestações clínicas encontradas em pacientes com múltiplas malformações congênitas (Stankiewicz et al., 2010 e Southard et al., 2012).

Em parte, a aplicação das técnicas de MLPA e de array em células do sangue periférico, para portadores de síndromes de microdeleção e microduplicação, ajudou a distinguir as CNVs associadas ao fenótipo, agora possíveis de serem consultadas em diferentes bancos de dados públicos de sequências genômicas, como: *Database of Genomic Variants* (DGV) em <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), o *UCSC Genome Browser – UC Santa Cruz* em <http://genome.ucsc.edu>, o *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER) em <http://decipher.sanger.ac.uk> e o *International Collaboration for Clinical Genomics* (ICCG) em <http://www.iccg.org>.

Mas a caracterização precisa dos efeitos patogênicos das CNVs em diferentes tecidos é frequentemente desconhecida (King et al., 2015). Assim, na tentativa de estabelecer uma associação adequada dos achados do presente trabalho em diferentes tecidos e o fenótipo dos pacientes, buscou-se nos bancos acima citados e na literatura elementos para as considerações realizadas a seguir.

O paciente 1, com agenesia renal direita e malformação renal esquerda, apresentou pela técnica de MLPA uma duplicação do gene *TYMS*, localizado no braço curto do cromossomo 18, na região genômica 18p11.32. Entre as alterações estruturais conhecidas no gene *TYMS*, estão diferentes mutações e mais comumente a expansão no número de *tandem repeats* que promove sua superexpressão (Kawakami et al., 2001; Trinh et al., 2002).

O gene *TYMS* é responsável pela produção de uma enzima folato-dependente denominada timidilato sintetase que atua nos processos de metilação, síntese e reparo do DNA. Uma vez que a quantidade da enzima timidilato sintetase está aumentada, a concentração de folato se encontra diminuída no plasma sanguíneo (Kawakami et al., 2001; Trinh et al., 2002).

Weiner e colaboradores ressaltam que o folato tem ação importante na prevenção de defeitos congênitos, incluindo os que envolvem o sistema geniturinário (Weiner et al., 2012). Assim, a diminuição do folato pode ter contribuído diretamente para o aparecimento da malformação renal nesse paciente.

Para o paciente 3 do presente estudo, o exame radiológico do tórax realizado *post-mortem* mostrou uma caixa torácica pequena, membros pequenos e com deformidades, mas não conseguiu concluir um diagnóstico efetivo para Displasia Tanatofórica tipo II. A investigação citogenômica revelou para este paciente a deleção do gene *CHL1*.

Na literatura, a deleção do gene *CHL1* está associada com deficiência intelectual na Síndrome de deleção 3p (Angeloni et al., 1999) e com o surgimento de hidrocefalia (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHL1>). O gene *CHL1* pertence à família das L1, que codifica moléculas de adesão celular que pode interagir com o gene *L1CAM*, correlacionado com a síndrome CRASH (*Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Aphasia, Spastic paraplegia and Hydrocephalus*). Estudo com camundongos revelaram que a deficiência de L1 está associada com o aumento dos ventrículos laterais no cérebro, sendo esta uma das causas primárias da hidrocefalia (Montag-Sallaz et al., 2002).

O paciente 3 apresenta malformações esqueléticas graves e hidrocefalia, sugerindo que a deleção encontrada, do gene *CHL1*, pode estar relacionada com o quadro malformativo.

O paciente 4 apresentou a deleção do gene *HIC1* em 17p13.3, na região de genes contíguos associados à Síndrome de Miller-Dieker (SMD). Os pacientes com SMD apresentam diversas alterações fenotípicas, entre elas a lisencefalia, dismorfias faciais, anomalias cardíacas, no sistema gastrointestinal e geniturinário (Grimm et al., 1999).

A atividade do gene *HIC1* pode estar relacionada com o desenvolvimento anormal do nariz, boca, extremidades, trato gastrointestinal e renal em pacientes com SMD. O paciente em questão é portador de alteração cardíaca grave e outras malformações associadas, entretanto, não é portador de alterações no sistema nervoso central (Grimm et al., 1999; Jugessur et al.,

2010).

O estudo funcional do gene *HIC1* em camundongos transgênicos (*HIC1* - *deficient mice*) mostrou que esses animais morreram no período neonatal exibindo uma variedade de combinações de defeitos congênitos incluindo acrania, exoencefalia, fenda palatina, anomalias dos membros e onfalocele (Carter et al., 2000).

A presente investigação mostrou que as demais regiões envolvidas na SMD estavam com número de cópias gênicas normais, o que pode explicar a ausência de características completas desta doença no paciente avaliado.

Assim, mesmo que o efeito da deleção do gene *HIC1* ainda não seja completamente conhecido, não se pode descartar sua contribuição para o quadro clínico do paciente, sendo que a interpretação final dessa associação vai depender de novos relatos da comunidade científica.

O paciente 28 teve como suspeita clínica inicial a Síndrome Velo-Cardio-Facial (SVCF), mas a análise com a utilização do *Kit* P064 mostrou número de cópias genômicas normais para a região crítica da SVCF em 22q11.2.

Inesperadamente encontramos a deleção do gene *TOM1L2*, localizado no braço curto do cromossomo 17, que codifica uma proteína envolvida no transporte intracelular e é predominantemente expressa em tecido cardíaco e no cérebro (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000175662-TOM1L2/tissue>).

Na literatura a região 17p11.2 está associada com a região crítica para a Síndrome de Smith-Magenis (SMS), sendo uma região de genes contíguos de aproximadamente 4 Mb que está deletada em 90% dos pacientes com SMS, e engloba o gene *TOM1L2* (Bi et al., 2002).

Os pacientes com SMS apresentam ADNPM, problemas comportamentais e alterações neurocognitivas, baixa estatura, anormalidades craniofaciais menores e braquidactilia. Menos frequentemente, anormalidades cardíacas, renais, oftalmológicas e otorrinolaringológicas bem como manifestações multissistêmicas variáveis são identificadas nos pacientes com SMS. (Li et al.; 2015)

Relativamente pouco se sabe sobre a atuação do gene *TOM1L2*, além do fato que ele pode ser importante para o recrutamento intracelular de clatrina nos endossomos, e apresenta alto nível de conectividade com outros genes

intimamente associados com a doença de Alzheimer no interatoma humano (<http://string-db.org/>).

E, como encontrou-se a deleção justamente no tecido cerebral podemos pensar que esses resultados, no mínimo, sugerem maior atenção as alterações no gene *TOM1L2*, justificando futuras investigações de replicação (Reynolds et al., 2010)

6.3. Mutação de ponto

O paciente 30 apresentou malformação esquelética letal sugestiva de Displasia Tanatofórica tipo I (DTI), que é uma doença caracterizada pelo encurtamento dos membros com macrocefalia, tórax e costelas estreitas e ossos longos curvos.

A etiologia genética da DTI está associada a diferentes mutações patogênicas espalhadas pelos éxons 7, 10, 15 e 19 do gene *FGFR3*, no cromossomo 4, sendo que a maioria resulta na formação de resíduos de cisteína no domínio extracelular do receptor da proteína, as três mutações mais conhecidas são p.R248C, p.S249C, e p.Y373C. Estas mutações de ponto de sentido trocado geram um aminoácido diferente do convencional com efeito deletério aos seus portadores (Rousseau et al., 1996; Pannier et al., 2009).

Considerando a forte possibilidade de DTI, utilizou-se para esse caso em particular, o sequenciamento por Sanger conforme descrito anteriormente em métodos, sendo identificada a mutação patogênica (c.746C>G – S249C) em heterozigose no éxon 7 do gene *FGFR3* no DNA do fígado.

O estudo *post-mortem* para os casos de DTI são raríssimos na literatura, e apesar da detecção molecular da mutação ser imprescindível para o aconselhamento genético, para reportar a incidência e para entender o modo de ocorrência, não foi encontrado casos de autopsias com investigação molecular (Davanageri et al., 2014).

6.4. Outras anormalidades

A investigação *post-mortem* de pacientes com anormalidades do desenvolvimento sexual, utilizando diferentes técnicas citogenômicas, foi informativa para a relação genótipo-fenótipo nos casos 6 e 19 do presente estudo.

Para o paciente 6, com genitália externa masculina, o resultado da análise do DNA por MLPA mostrou um número de cópias gênicas normais para o cromossomo X e ausência do gene *SRY*. Nesse caso, um resultado normal para o sexo feminino foi sugestivo de um quadro de virilização sexual.

Existem diversas causas para a virilização de pacientes com resultado genômico feminino, como a hiperplasia adrenal congênita (HAC), a presença de linhagens celulares discordantes no mesmo feto (mosaicismo e quimerismo) e as mutações e translocações gênicas (Cordinhã et al., 2011; Xiao et al., 2013).

Dentre as alterações gênicas, a presença do gene *SRY* translocado para o cromossomo X devido a um erro no *crossing-over*, que ocorre de forma desigual entre as regiões pseudoautossômicas dos cromossomos sexuais, é uma das explicações para portadores de cariótipo 46,XX e genitália masculina.

Outro gene, o *CYP21* localizado em 6p21.3 quando alterado por recombinação homóloga não-alélica ou por deleção de regiões de alta similaridade no momento do *crossing-over*, provoca deficiência da enzima 21-hidroxilase que está relacionada a virilização na HAC (Cordinhã et al., 2011). Também a duplicação do gene *SOX9*, na região 17q24.3, pode promover a diferenciação sexual anormal nos casos de pacientes com deleção para o gene *SRY*, como apresentado no paciente 6.

A expressão ectópica do *SOX9* em camundongos revelou a reversão sexual em pacientes 46,XX para sexo masculino e acredita-se que uma duplicação de aproximadamente 74 kb neste gene seja a responsável pela reversão sexual (Xiao et al., 2013).

O paciente 6 desse estudo apresentava outras malformações congênitas concomitantes e, na literatura, é relatada a variabilidade fenotípica entre os pacientes portadores de hiperplasia adrenal congênita (Xiao et al., 2013).

O paciente 19 apresentava genitália ambígua no exame macroscópico. Na realização da dissecação das estruturas, foi observada a presença de vagina, útero e tubas uterinas, indicando o sexo genital do paciente como feminino.

A investigação citogenômica com a técnica de MMS revelou a presença de marcador AMEL em um único pico, compatível com di-alelia para o sexo feminino. A análise do DNA *post-mortem* foi importante para a confirmação sexo-genômica do paciente, uma vez que a genitália externa era ambígua.

O método MMS foi realizado para obtenção de um resultado inequívoco, uma vez que pela técnica de MLPA são necessárias aproximadamente 40 regiões específicas íntegras do genoma, o que torna algumas amostras não perfeitamente confiáveis para esta técnica.

6.5. Implantação das técnicas

A avaliação das diferentes formas de conservação de tecidos para a extração de DNA revelou que os tecidos armazenados em RNA *later* obtiveram qualidade e quantidade superiores às amostras conservadas em formol e emblocadas em parafina, sendo a utilização do RNA *later* como conservante para o fragmento tecidual colhido no momento da necropsia a maneira mais indicada para conservação do material genético e posterior análise (Kaneko et al., 2015).

A experiência adquirida com a realização do presente estudo mostrou que o sucesso do resultado da análise citogenômica está diretamente condicionado a qualidade da amostra, sendo considerado ideal para investigação utilizando a técnica de MLPA o DNA com fragmentos de ≥ 750 pb.

A realização da técnica de MLPA nessas amostras mostrou-se eficaz, sendo possível a confirmação dos resultados utilizando tanto a técnica de FISH quanto a técnica de *array*, inclusive com a possibilidade de detecção de casos de mosaicismos.

Para os casos que apresentaram DNA com fragmentos menores que 750 pb, a técnica de MMS mostrou-se uma alternativa interessante para a investigação de casos com forte suspeita para aneuploidias completas e uma possível ferramenta para a investigação de mosaicismos teciduais. Entretanto,

devido à baixa quantidade de marcadores disponíveis para cada cromossomo, é necessária a confirmação por outras técnicas.

Por outro lado, a técnica de Microssatélites foi uma alternativa encontrada para a avaliação de amostras de DNA prejudicados quanto a sua qualidade e integridade, mesmo após terem passado nos controles de qualidade descrito anteriormente nos métodos. Ainda, deve-se considerar que quando a triagem clínica é bem realizada e direciona a investigação citogenômica para genes específicos, as chances de sucesso são maiores, uma vez que o número de sequências dependentes da integridade é menor.

Ainda, ressalta-se que a interpretação das variações no número de cópias gênicas associadas ao fenótipo, independente da técnica utilizada, relatadas e discutidas neste estudo, refletem o estágio atual do conhecimento e, podem ser reexaminadas, dependendo de novos achados e evidências científicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recentemente, as técnicas citogenômicas têm sido amplamente utilizadas para a identificação de aberrações cromossômicas submicroscópicas, como as microdeleções e microduplicações (Southard et al., 2012). No entanto, a maioria desses trabalhos é realizado em amostras de DNA extraído de linfócitos de sangue periférico, assumindo que em todos os tecidos dos indivíduos afetados exista a mesma anormalidade genômica.

Por comparação, pouca atenção tem sido dada a possibilidade da ocorrência de mosaicismo intra ou interespecífico, que na verdade pode representar um impacto médico muito importante. (King et al., 2015). Para o paciente 17 desse estudo, por exemplo, a presença de 3 linhagens celulares diferentes no tecido hepático e duas linhagens diferentes no tecido cerebral, mostrou claramente que o mosaicismo intratecidual e intertecidual associado o fenótipo pode estar subdiagnosticado em muitos indivíduos.

Assim, o presente trabalho mostrou que o mosaicismo pervasivo pode estar relacionado com a elevada variabilidade fenotípica nos pacientes com alterações genômicas e anormalidades congênitas. A presença concomitante de linhagens celulares alteradas e/ou normais em diferentes tecidos pode perturbar o equilíbrio gênico celular e consequentemente alterar a manifestação clínica dos pacientes (Costa et al., 2015). A investigação citogenômica *post-mortem* em diferentes tecidos abre uma nova perspectiva para o entendimento do papel da dosagem gênica e sua relação com as anormalidades congênitas.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho conclui-se que:

- ✓ Foi possível estudar e caracterizar molecularmente a presença de anormalidades no DNA, desde aneuploidias até a variação do número de cópias gênicas (CNVs) em diferentes tecidos de pacientes falecidos portadores de MCs.
- ✓ A técnica de MLPA em amostras teciduais *post-mortem* foi padronizada de maneira eficiente no Laboratório de Citogenômica.
- ✓ Com a realização deste trabalho foi possível investigar alterações genômicas tecido-específicas, revelando padrões de mosaicismos inter e intratecidual relevantes ao fenótipo.

ANEXO A

**Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P095 – A2 ou A3 Aneuploidy
- da MLPA, com a exata posição genômica e o comprimento dos picos –
(NCBI36/hg18)**

<i>Kit</i>	<i>Gene</i>	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P095	<i>BRCA2</i>	15	13q13.1	31.828.619	31.828.685	00452-L00360	355
P095	<i>CCNA1</i>	9	13q13.3	35.914.315	35.914.385	00799-L00317	178
P095	<i>RB1</i>	27	13q14.2	47.952.212	47.952.267	00582-L00147	220
P095	<i>DLEU1</i>	2	13q14.2	49.576.840	49.576.904	00801-L00639	400
P095	<i>DACH1</i>	2	13q21.33	71.153.962	71.154.035	02125-L01636	265
P095	<i>ABCC4</i>	23	13q32.1	94.525.703	94.525.764	00798-L00316	148
P095	<i>ARHGEF7</i>	24	13q34a	110.755.885	110.755.955	00871-L00461	310
P095	<i>ING1</i>	4	13q34b	110.169.589	110.169.650	00802-L00320	445
P095	<i>MC2R</i>	2	18p11.21	13.874.728	13.874.796	02847-L02277	436
P095	<i>TYMS</i>	7	18p11.32	662.881	662.947	00811-L00329	301
P095	<i>SS18</i>	4	18q11.2a	21.891.578	21.891.641	02845-L02275	211
P095	<i>SS18</i>	6	18q11.2b	21.873.281	21.873.344	02846-L02276	391
P095	<i>SMAD4</i>	2	18q21.2	46.827.449	46.827.521	02127-L01638	142
P095	<i>PMAIP1</i>	2	18q21.32	55.720.855	55.720.902	00808-L00326	172
P095	<i>SERPINB2</i>	4	18q21.33	59.713.531	59.713.594	00810-L00328	346
P095	<i>NFATC1</i>	9	18q23	75.328.472	75.328.535	00807-L00325	255
P095	<i>HSPA13</i>	2	21q11.2	14.675.469	14.675.536	00816-L00334	247
P095	<i>NCAM2</i>	12	21q21.1a	21.726.306	21.726.376	00813-L00636	166
P095	<i>USP25</i>	24	21q21.1b	16.172.591	16.172.654	02115-L01605	202
P095	<i>APP</i>	18	21q21.3	26.191.764	26.191.825	00812-L00330	337
P095	<i>SOD1</i>	4	21q22.11a	31.961.449	31.961.523	02116-L01604	291
P095	<i>TIAM1</i>	25	21q22.11b	31.425.072	31.425.138	00817-L00335	427
P095	<i>SIM2</i>	11	21q22.13	37.043.875	37.043.945	00815-L00333	136
P095	<i>TFF1</i>	1	21q22.3	42.659.616	42.659.687	02834-L02265	382
P095	<i>TSPAN7</i>	5	Xp11.4	38.419.894	38.419.963	02904-L02370	274
P095	<i>DMD</i>	69	Xp21.2	31.108.419	31.108.491	01388-L02509	454
P095	<i>ARX</i>	4	Xp21.3	24.935.147	24.935.214	02898-L02369	229
P095	<i>RPS6KA3</i>	3	Xp22.12	20.137.343	20.137.419	02906-L02300	364
P095	<i>AR</i>	1	Xq12	66.682.270	66.682.328	00652-L00637	154
P095	<i>ACSL4</i>	17	Xq23	108.773.977	108.774.047	02155-L01607	184
P095	<i>AIFM1</i>	15	Xq26.1	129.093.370	129.093.436	00820-L00338	409

<i>Kit</i>	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Início	Fim	Sonda	Comprimento da sonda (pb)
P095	<i>L1CAM</i>	4	Xq28	152.790.845	152.790.917	00819-L00337	319
P095	<i>SRY</i>	1	Yp11.31a	2.715.484	2.715.556	02153-L00596	160
P095	<i>SRY</i>	1	Yp11.31b	2.715.122	2.715.176	02152-L00592	193
P095	<i>UTY</i>	1	Yq11.221	14.101.047	14.101.084	01071-L00464	240
P095	<i>ZFY</i>	4	Yp11.31	2.889.252	2.889.319	04189-L03982	283

ANEXO B

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>	<i>Gene</i>	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>METT16</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

<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>
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 C

Genes e sondas correspondentes presentes no *kit* P064 – C1 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>TNFRSF4</i>	3	1p36.33	1.138.225	1.138.276	09198-L21007	404
P064	<i>GABRD</i>	6	1p36.33	1.949.449	1.949.511	13354-L20946	148
P064	<i>PEX10</i>	2	1p36.32	2.331.696	2.331.754	04678-L22755	315
P064	<i>ACTRT2</i>	1	1p36.32	2.928.350	2.928.410	14271-L22751	136
P064	<i>TACC3</i>	4	4p16.3	1.700.130	1.700.202	15440-L21012	453
P064	<i>WHSC1</i>	5	4p16.3	1.872.456	1.872.525	13764-L20957	199
P064	<i>WHSC1</i>	9	4p16.3	1.902.200	1.902.274	06058-L05513	445
P064	<i>WHSC1</i>	25	4p16.3	1.950.156	1.950.230	06060.L17912	238
P064	<i>TERT</i>	13	5p15.33	1.311.706	1.311.769	08653-L23271	364
P064	<i>TERT</i>	2	5p15.33	1.346.495	1.346.564	08643-L23399	268
P064	<i>CLPTM1L</i>	5	5p15.33	1.391.037	1.391.097	13357-L23702	251
P064	<i>IRX4</i>	5	5p15.33	1.931.281	1.931.344	15433-L17263	372
P064	<i>CTNND2</i>	2	5p15.2	11.785.304	11.785.369	03073-L21008	413
P064	<i>NSD1</i>	2	5q35.2	176.493.894	176.493.966	14898-L20967	264
P064	<i>NSD1</i>	15	5q35.3	176.619.619	176.619.683	17561-L20962	232
P064	<i>NSD1</i>	24	5q35.3	176.654.366	176.654.433	01301-L20954	181
P064	<i>TWIST1</i>	1	7p21.1	19.123.766	19.123.828	04915-L20996	355
P064	<i>TWIST1</i>	up	7p21.1	19.125.427	19.125.497	04916-L20966	256
P064	<i>ELN</i>	4	7q11.23	73.090.003	73.090.066	13361-L20998	388
P064	<i>ELN</i>	6	7q11.23	73.094.914	73.094.972	01334-L14434	339
P064	<i>ELN</i>	27	7q11.23	73.115.357	73.115.423	13365-L23317	469
P064	<i>TRPS1</i>	3	8q23.3	116.700.557	116.700.630	07371-L20961	226
P064	<i>EIF3H</i>	2	8q24.11	117.837.051	117.837.121	13351-L14781	130
P064	<i>EXT1</i>	2	8q24.11	118.918.440	118.918.506	12567-L23738	274
P064	<i>FSHB</i>	3	11p14.1	30.212.266	30.212.330	07075-L20952	170
P064	<i>DCDC1</i>	4	11p13	31.285.887	31.285.951	07077-L20953	175
P064	<i>PAX6</i>	3	11p13	31.789.032	31.789.103	06025-L20947	159
P064	<i>SNRPN</i>	u5	15q11.2	22.716.791	22.716.857	12478-L20999	396
P064	<i>SNRPN</i>	il CpG	15q11.2	22.750.781	22.750.852	11180-L20960	219
P064	<i>UBE3A</i>	14	15q11.2	23.135.402	23.135.477	10887-L20995	346
P064	<i>UBE3A</i>	5b	15q11.2	23.201.527	23.201.599	10879-L23740	287
P064	<i>CREBBP</i>	3	16p13.3	3.800.566	3.800.638	09883-L23742	298

<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>
P064	<i>CREBBP</i>	31	16p13.3	3.717.675	3.717.743	03088-L22752	141
P064	<i>METTL16</i>	1	17p13.3	2.361.823	2.361.890	01924-L22759	436
P064	<i>PAFAH1B1</i>	1	17p13.3	2.443.762	2.443.818	15683-L20955	187
P064	<i>PAFAH1B1</i>	2	17p13.3	2.488.280	2.488.352	07276-L22756	323
P064	<i>PAFAH1B1</i>	11	17p13.3	2.531.787	2.531.857	01925-L23741	292
P064	<i>RAI1</i>	1	17p11.2	17.525.905	17.525.962	16587-L20964	244
P064	<i>RAI1</i>	3	17p11.2	17.636.976	17.637.039	16591-L21009	421
P064	<i>RAI1</i>	6	17p11.2	17.654.897	17.654.968	16526-L20951	165
P064	<i>TOM1L2</i>	1	17p11.2	17.816.505	17.816.575	04669-L20956	193
P064	<i>JAG1</i>	1	20p12.2	10.602.274	10.602.343	03072-L21021	483
P064	<i>JAG1</i>	21	20p12.2	10.571.164	10.571.225	05989-L23739	281
P064	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	17.621.597	17.621.661	05462-L20958	205
P064	<i>CDC45</i>	1	22q11.21	17.847.478	17.847.540	05463-L23743	476
P064	<i>GNB1L</i>	8	22q11.21	18.156.405	18.156.463	07487-L22757	331
P064	<i>DGCR8</i>	2	22q11.21	18.453.612	18.453.678	08475-L20946	154
P064	<i>ZNF74</i>	2	22q11.21	19.079.428	19.079.495	05927-L20959	211
P064	<i>MED15</i>	10	22q11.21	19.266.745	19.266.813	18308-L05816	461
P064	<i>SNAP29</i>	3	22q11.21	19.565.377	19.565.455	16748-L23315	380
P064	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	49.413.270	49.413.327	02707-L22754	306
P064	<i>SHANK3</i>	18	22q13.33	49.491.410	49.491.470	14193-L22758	428

ANEXO D

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 E**Laboratório de Citogenômica – LIM 03
Departamento de Patologia
HC/FMUSP**

Nome:
Médico Patologista:

Registro DAP:

Data do óbito:
Registro:

Técnica: _____
(Triagem citogenômica)

Material: Tecido ____ **conservado em** _____

Método: _____

Finalidade: Investigação da presença da variação no número de cópias/mutação utilizando o *kit* ____ (fabricante). Este *kit* contempla _____.

Resultado

rsa (____) x; nuc ish _____; e.g.

Coordenada genômica: _____

A análise com o *kit* _____ evidenciou a _____ das sondas/regiões do cromossomo _____.

Interpretação e Conclusão

Este resultado indica que o paciente apresenta as seguintes alterações genômicas _____ no cromossomo ____ no tecido investigado. O paciente pode apresentar alterações em outras regiões não pesquisadas, bem como mutações pontuais que este *kit* não detecta.

São Paulo, ____ de ____ de ____.

ANEXO F

Média das quantificações, razões 260/280 e 260/230 das amostras de DNA conforme o tipo de conservante utilizado.

Concentração das amostras de DNA (ng/μL) por tecido e conservante						
Conservante	Pele	Diafragma	Coração	Cérebro	Pulmão	Fígado
Formol	383,9	229,9	166,0	NA	1.639,0	749,1
RNA later	667,4	628,2	774,1	978,9	NA	1.053,7
Parafina	84	NA	NA	NA	NA	103,5

Grau de Pureza - Razão 260/280						
Conservante	Pele	Diafragma	Coração	Cérebro	Pulmão	Fígado
Formol	1,819	1,818	1,860	NA	1,811	1,807
RNA later	1,891	1,885	1,866	1,914	NA	1,895
Parafina	1,720	NA	NA	NA	NA	1,784

Grau de Pureza - Razão 260/230						
Conservante	Pele	Diafragma	Coração	Cérebro	Pulmão	Fígado
Formol	2,075	2,229	2,069	NA	1,915	1,896
RNA later	2,098	1,948	2,048	2,223	NA	1,872
Parafina	1,662	NA	NA	NA	NA	1,917

ANEXO G

Imagem da corrida eletroforética evidenciando as amostras de DNA de tecido conservado em RNA *later*.

Nota: Apesar da presença de “rastro” na foto do gel, destaca-se em vermelho fragmentos maiores de DNA nos tecidos conservados em RNA *later*.

ANEXO H

Imagem da corrida eletroforética evidenciando as amostras de DNA de tecido conservado em formol e parafina. A formalização e parafinização dos tecidos interferem na integridade da molécula de DNA.

Nota: A corrida da amostra em formol revela a presença de fragmentos de DNA não totalmente íntegros, enquanto a corrida da amostra de DNA extraída de tecido embocado em parafina apresenta “rastro”, indicando alta fragmentação do DNA.

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

Amorim MMR, Vilela PC, Santos ARVD, Lima ALMV, Melo EFP, Bernardes HF, Menezes Filho PFB, Guimarães VB. Impacto das malformações congênitas na mortalidade perinatal e neonatal em uma maternidade-escola do Recife. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2006; 6(Supl.1):519-525.

Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei MH, Lerman MI. CALL gene is haploinsufficient in a 3p- syndrome patient. *Am J Med Genet.* 1999;86:482-5.

Bi W, Yan J, Stankiewicz P, Park SS, Walz K, Boerkoel CF, Potocki L, Shaffer LG, Devriendt K, Nowaczyk MJ, Inoue K, Lupski JR. Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Res.* 2002;12:713-28.

Biesecker LG & Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature Reviews.* 2013;14:307-321.

Campos CM, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104:24-31.

Carter MG, Johns MA, Zeng X, Zhou L, Zink MC, Mankowski JL, Donovan DM, Baylin SB. Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *HIC1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9:413-9.

Cereda A, Carey JC. The Trisomy 18 Syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2012;7:81.

Christofolini DM, de Paula Ramos MA, Kulikowski LD, da Silva Bellucco FT, Belangero SI, Brunoni D, Melaragno MI. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. *J Intellect Disabil Res.* 2010;54:938-42.

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;5:1-8.

Cordinhã C, Morais S, Cardoso R, Ramos L, Taborda A, Mirante A. Hiperplasia Congênita da Supra-renal: quando o mesmo genótipo tem diferentes fenótipos. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 2011; 41-6.

Costa LSA, Zandona-Teixeira AC, Montenegro MM, Dias AT, Dutra RL, Honjo RS, Bertola DR, Kulikowski LD, Kim CA. Cytogenomic delineation and clinical follow-up of 10 Brazilian patients with Pallister-Killian syndrome. *Molecular Cytogenetics*. 2015; 8:43

DATASUS 2015. Disponível em <http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/infantil.show.mtw>.

Davanageri RS, Shokeen PD, Bannur HB, Patil KP. Thanatophoric Dysplasia Type I: A Rare Case Report at Fetal Autopsy. *J Lab Physicians*. 2014;6:121–3.

Dias AT, Dutra RL, Zanardo EA, Souza FASL, Novo-Filho GM, Piazzon FB, Montenegro MM, Costa TVMM, Kim CA, Kulikowski LD. Investigação citogenômica *post-mortem* em portadores de malformações congênitas revela mosaicismo intratecidual e CNVs patogênicas. In: *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Genética Médica*. 2014;105:48.

Dutra LD; Honjo RS; Macaferri FF; Pieri PC; Débora Bertola; Kulikowski LD; Jehee FMS; Kim CA. Microsatellite Markers and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA): Diagnosis tests for Williams-Beuren syndrome. *Eur J Med Genet*. 2011;5:13.

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

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7:85-97.

Filges I, Kunz C, Miny P, Boesch N, Szinnai G, Wenzel F, Tschudin S, Zumsteg U, Heinemann K. A novel missense mutation in the high mobility group domain of SRY drastically reduces its DNA-binding capacity and causes paternally transmitted 46,XY complete gonadal dysgenesis. *Fertil Steril*. 2011;96:851-5.

GeneCards - Human Genes Database. Disponível em <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHL1>

Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn*. 2008;28:119-25

Gniady JP, Isaacson G, Ladda RL. “Mosaic trachea” in a child with trisomy 9 mosaicism. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2010;74: 1193-5.

Golabi M, James AW, Good WV, Cotter PD. Tissue-limited mosaicism for monosomy 13. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152A:2634-9.

Grimm, C., Sporle, R., Schmid, T. E., Adler, I.-D., Adamski, J., Schughart, K., Graw, J. Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene *Hic1*, the homologue of *HIC1*, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 1999;8:697-710.

Halushka MK, Stetten G, McMichael JL, Blakemore KJ, Hutchins GM. Autopsy Findings of a 37-Year-Old Man With a Complex Mosaic Karyotype Involving del(18p), Monosomy 13, and Trisomy 20. *American Journal of Medical Genetics.* 2005;135A:181–185.

Hennekam RC, Biesecker LG, Allanson JE, Hall JG, Opitz JM, Temple IK, Carey JC.. Elements of morphology: General terms for congenital anomalies. *Am J Med Genet Part A.* 2013;161A:2726–2733.

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.

Horovitz DDG, Llerena Jr JC, Mattos, RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad. Saúde Pública.* 2005; 21:1055-64.

Hughes-Stamm SR, Ashton KJ, van Daal A. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *Int J Legal Med.* 2011;125:341–8.

Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Nguyen TT, Christiansen L, Lidral AC, Murray JC. Maternal genes and facial clefts in offspring: a comprehensive search for genetic associations in two population-based cleft studies from Scandinavia. *PloS one.* 2010; 5(7):e11493.

Kaneko Y, Ohira H, Tsuda Y, Yamada Y. Comparison of hard tissues that are useful for DNA analysis in forensic autopsy. *Leg Med (Tokyo).* 2015;pii:S1344-6223(15)30002-X.

Kawakami, K., Salonga, D., Park, J. M., Danenberg, K. D., Uetake, H., Brabender, J., Omura, K., Watanabe, G., Danenberg, P. V. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin. Cancer Res.* 2001;7: 4096-4101.

King DA, Jones WD, Crow YJ et al; Mosaic structural variation in children with developmental disorders. *Hum Mol Genet.* 2015;24:2733-45.

Koide K. Slonim DK, Johnson KL, Tantravahi U, Cowan JM, Bianchi DW. Transcriptomic Analysis of Cell-Free Fetal RNA Suggests a Specific Molecular Phenotype in Trisomy 18. *Hum Genet.* 2011;129:295–305.

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.

Leon E, Zou YS, Milunsky JM. Mosaic Down syndrome in a patient with low-level mosaicism detected by microarray. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:3154-6.

Lescoat D, Jouan H, Loeuillet-Olivo L, Le Calvé M. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on paraffin-embedded placental tissues as an adjunct for understanding the etiology of early spontaneous abortion. *Prenat. Diagn*. 2005;25:314-7.

Li Z, Shen J, Liang J, Sheng L. . Congenital scoliosis in Smith-Magenis syndrome: a case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e705.

Lu T, Ferry M, Weiss R, Hasty J.A molecular noise generator. *Phys Biol*. 2008;5:036006.

Lupski JR. Structural Variation Mutagenesis of the Human Genome: Impact on Disease and Evolution. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2015;56:419-36.

Lyle R et al. Genotype–phenotype Correlations in Down Syndrome Identified by Array CGH in 30 Cases of Partial Trisomy and Partial Monosomy Chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*. 2009;17:454-466.

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.

Mkrtchyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytko A, Manvelyan M, et al. Early Embryonic Chromosome Instability Results in Stable Mosaic Pattern in Human Tissues. *PLoS ONE*. 2010;5:e9591.

Montag-Sallaz M, Schachner M, Montag D. Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7967-81.

O'Huallachain M, Konrad JK, Weissmand SM, Urban,AE, Snyder MP. Extensive genetic variation in somatic human tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:18018-23.

Obu HA, Chinawa JM, Uleanya ND, Adimora GN, Obi IE. Congenital malformations among newborns admitted in the neonatal unit of a tertiary hospital in Enugu, South-East Nigeria - a retrospective study. *BMC Research Notes*. 2012;5:177.

Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D, Poinar HN. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem*. 2010;400:110-7.

Oliveira RMR et al. Y Chromosome in Turner Syndrome: Review of the Literature. *São Paulo Med J*. 2009;127:373-8.

Pannier S, Martinovic J, Heuertz S, Delezoide AL, Munnich A, Schibler L, Serre V, LegeaiMallet L.. Thanatophoric dysplasia caused by double missense FGFR3 mutations. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149A:1296–1301.

Papavassiliou P, York TP, Gursoy N, Hill G, Nicelly LV, Sundaram U, McClain A, Aggen SH, Eaves L, Riley B, Jackson-Cook C. The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149A:573-583.

Paskulin GA et al. Importância da Análise Cromossômica dos Fibroblastos em Casos Suspeitos de Mosaicismo: Experiência de um Serviço de Genética Clínica. *Rev. Paul. Pediatr*. 2011; 29:1.

Pereira RJS, Abreu LC, Valenti VE, Albuquerque WDM, Pereira SC, Araújo R, Ferreira Neto ML, Santos SM. Frequência de malformações congênitas das extremidades em recém-nascidos. *Rev. Bras. Crescimento Desenvolv Hum*. 2008;18:155-162.

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

Polita NB, Ferrari RAP, Moraes PS, Sant'Anna FL, Tacla MTGM. Anomalias congênitas: internações em unidade pediátrica. *Rev Paul Pediatr* 2013;31:205-10.

Post-Mortem/Autopsy Testing Specimens; Laboratory for Molecular Medicine. Disponível em: <http://personalizedmedicine.partners.org/Laboratory-For-Molecular-Medicine/Ordering/Sample-Requirements-Payment-Shipping.aspx>

Pretto D, Yrigollen CM, Tang HT, Williamson J, Espinal G, Iwahashi CK, Durbin-Johnson B, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Tassone F. Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Front Genet.* 2014;5:318.

Rasmussen SA, Olney RS, Holmes LB, Lin AE, Keppler-Noreuil KM, Moore CA. Guidelines for Case Classification for the National Birth Defects Prevention Study. *The National Birth Defects Prevention Study - Birth Defects Research (Part A)*. 2003;67:193–201.

Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, Blennow K, Wiklund F, Johansson B, Malmberg B, Berg S, Alexeyenko A, Grönberg H, Gatz M, Pedersen NL, Prince JA. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near *SREBF1/TOM1L2/ATPAF2* with dementia risk. *Hum Mol Genet.* 2010;19:2068–2078.

Rousseau, F., El Ghouzzi, V., Delezoide, A. L., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Bonaventure, J. Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum. Molec. Genet.* 1996;5: 509-512.

Rowe LR, Thaker HM, Opitz JM, Schiffman JD, Haddadin ZM, Erickson LK, South STJ. Molecular inversion probe array for the genetic evaluation of stillbirth using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Mol Diagn.* 2013;15:466-72.

Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet.* 2004;66:265-275.

Saxena AK. Congenital Anomalies of Soft Tissues: Birth Defects Depending on Tissue Engineering Solutions and Present Advances in Regenerative Medicine. *Tissue Engineering: Part B*. 2010;16:5.

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

Soares H, Maia A, Campos M, Dória S, Lopes JM, Fontoura M. Clinicopathological features of 45,X/46,Xidic(Y) mosaicism and therapeutic implications: case report. *Sao Paulo Med. J.* 2008;126:297-9.

Southard AE, Edelmann LJ, Gelb BD. Role of Copy Number Variants in Structural Birth Defects. *Pediatrics.* 2012;129:755-63.

Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell.* 2006;126.

Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010;61:437-55.

STRING - *Known and Predicted Protein-Protein Interactions*. Disponível em <http://string-db.org>.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2012;13:3245-76.

Sun Z, Liu P, Jia X, Withers MA, Jin L, Lupski JR, Zhang F. Replicative mechanisms of CNV formation preferentially occur as intrachromosomal events: evidence from Potocki-Lupski duplication syndrome. *Hum Mol Genet*. 2013;22:749–756.

Toral-Lopez J, Gonzalez-Huerta LM, Cuevas-Covarrubias SA. Complete monosomy mosaic of chromosome 21: case report and review of literature. *Gene*. 2012;510:175-9.

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

Trinh, B. N., Ong, C.-N., Coetzee, G. A., Yu, M. C., Laird, P. W. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum. Genet*. 2002;111:299-302.

van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JNR, den Ridder-Klünne MC, Halley DJJ, van den Ouweland AMW. Multiplex ligation-depending probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19:1009-1012.

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.

Wada T, Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:510–514.

Wapner RJ. What Can We Expect From Invasive Procedures in 10 Years Time? *Prenat Diagn*. 2010;30:704–5.

Weiner AS, Gordeeva LA, Voronina EN, Boyarskikh UA, Shabaldin AV, Filipenko ML. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of having an offspring with congenital anomalies in the West Siberian region of Russia: a case-control study. *Prenat Diagn*. 2012;32:1041-8.

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

Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen YW, Tao J. A rare case of 46, XX SRY-negative male with approximately 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet.* 2013;56:695-8.

Youssoufian H., Pyeritz RE. Mechanisms And Consequences Of Somatic Mosaicism In Humans. *Nature Reviews Genetics* 3, 748-758.

Zhang F, Gu1 W, Hurles ME, Lupski JR. Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451–81.