**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

ROSANA MARIA CANDIDO DE SOUZA

**Microrrearranjos cromossômicos em síndromes
craniofaciais complexas**

**BAURU
2019**

ROSANA MARIA CANDIDO DE SOUZA

**Microrrearranjos cromossômicos em síndromes
craniofaciais complexas**

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação, na área de concentração Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientador: Dr. Antonio Richieri da Costa
Coorientadora: Dra. Roseli Maria Zechi Ceide
Coorientadora: Dra. Fernanda Maria Sarquis Jehee

**BAURU
2019**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

R. Silvio Marchione, 3-20
Caixa Postal: 1501
17012-900 - Bauru – SP – Brasil

Prof. Dr. Vahan Agopyan – Reitor da USP
Dr. José Sebastião dos Santos – Superintendente do HRAC-USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Rosana Maria Candido de Souza

Bauru, ____ de _____ de ____.

Souza, Rosana Maria Candido de
Microrrearranjos cromossômicos em síndromes
craniofaciais complexas/ Rosana Maria Candido de
Souza. – Bauru, 2019.
144 p.; il.; 31 cm.

Tese (Doutorado – Fissuras Orofaciais e
Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de
Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientador: Dr. Antonio Richieri da Costa
Coorientadora: Dra. Roseli Maria Zechi Ceide
Coorientadora: Dra. Fernanda Maria Sarquis Jehee

Comitê de Ética HRAC-USP
CAAE: 61744216.6.0000.5441
Data: 02/02/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosana Maria Candido de Souza

Tese apresentado ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Dr. Antonio Richieri da Costa

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Fukushiro

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de depósito da tese junto à SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por tudo o que sou, por me fortalecer e me permitir chegar até aqui.

Aos meus filhos **Maria Clara** e **João Gabriel**, a razão de tudo, por estarem sempre ao meu lado e me fazer uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por cuidar de cada detalhe da minha vida, não me deixar desanimar e me carregar no colo nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos, **Maria Clara e João Gabriel**, a melhor parte de mim, por seus sorrisos, beijos e abraços, por compreenderem a importância do meu trabalho e minha ausência em muitos momentos que precisaram de mim. Meu amor infinito.

Aos meus pais, **Adelone e Irma**, pelo amor incondicional e por terem me ensinado valores como a humildade, responsabilidade, ética, respeito, gratidão, persistência e por cuidarem com todo amor dos meus filhos na minha ausência.

Aos meus irmãos **Ellen, Lilian, Marlon e Marcos**, pela presença nos momentos difíceis, pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo**, lugar que amo e onde construí minha vida profissional. Tenho muito orgulho de ter sido aluna e profissional dessa instituição.

Aos **Pacientes e seus Familiares**, pelo aceite, participação e colaboração, sem os quais seria impossível a realização desse estudo.

Ao meu orientador **Dr. Antonio Richieri da Costa** pela oportunidade de aprender além da Genética, pelas valiosas observações e orientações e por sempre me receber com atenção, respeito e simpatia;

À minha coorientadora **Dra. Roseli Maria Zechi Ceide** por confiar e acreditar que eu seria capaz de realizar esse estudo, por compartilhar seus conhecimentos de Genética Clínica, pelo seu exemplo de ética e profissionalismo e por estar sempre do meu lado e não me deixar desanimar, por sua amizade, carinho e apoio.

À Chefe de Seção de Genética Clínica e amiga **Dra. Nancy Mizue Kokitsu Nakata**, pela amizade, carinho, apoio, confiança e incentivo.

À minha coorientadora **Dra. Fernanda Maria Sarquis Jehee**, por toda orientação molecular, colaboração, apoio, ensinamentos, atenção e disponibilidade.

Aos amigos e profissionais da Seção Genética Clínica **Dra. Siulan Vendramini Paulovich Pittoli, Ma. Camila Wenceslau Alvarez, Dra. Daniela Ruiz, Maria Aparecida Arazaboni**, por toda colaboração, apoio, pela confiança, companheirismo, acolhimento e amizade. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe.

Às grandes amigas de Seção de Genética Clínica e de pós-graduação **Dra. Priscila Padilha Moura**, por sua alegria e simpatia de sempre e **Dra. Marina Bigeli Rafacho**, pela sinceridade e por estar sempre disponível para ajudar, por nossas seções de terapia, cafés e chocolates, pelas risadas e amizade sincera.

À minha amiga **Dra. Maria Natália Leite de Medeiros**, pelo convite para fazer parte da diretoria da Associação de Alunos de Pós-Graduação do HRAC-USP, pela companhia e amizade.

Aos biólogos e amigos, **Me. Rubens Matias Rodrigues e Dra. Tânia Yoshico Kamiya**, do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, pela amizade e por me ensinarem a observar e entender cada detalhe da citogenética humana.

Às amigas e técnicas Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, **Tereza Cristina Marquez e Cibele Nazaré Alves Pereira Pires**, pelas palavras, amizade e colaboração;

Aos alunos de Iniciação Científica **Henrique Serigato e Marina Meyer** pela amizade e colaboração.

À **Dra. Maria Rita Passos Bueno**, por ter me recebido no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (Instituto de Biociências - USP/SP), pela acolhida, atenção e colaboração.

À **Dra. Naila Cristina Vilaça Lourenço**, do Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (Instituto de Biociências - USP/SP), pelo treinamento, pela disponibilidade, gentileza, pelo carinho e atenção em todas as minhas solicitações.

À **Dra. Kátia Maria da Rocha**, Laboratório de Testes do Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (Instituto de Biociências - USP/SP), pela disponibilidade, atenção e colaboração.

Às professoras **Dra. Dagma Venturini Marques Abramides** e **Dra. Dionísia Aparecida Cusin Lamônica**, do Departamento de Fonoaudiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru por terem me recebido com tanto carinho e atenção durante o estágio de aperfeiçoamento de ensino (PAE), pela oportunidade, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Ao meu amigo, colega de profissão **Dr. Bruno Lara Zarella**, por todo apoio e incentivo, amizade e pela oportunidade de iniciar uma nova etapa da minha vida profissional.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação **Ana Regina Carvalho, Maria José Bento Lopes** e **Lucy Honda** por todo apoio e orientações.

Aos funcionários **Rose** e **Rafael**, da Unidade de Ensino e Pesquisa, pelo apoio, atenção, orientação e colaboração.

À funcionária **Denise Giacheti**, da Biblioteca da FOB-USP, pela gentileza, disponibilidade e criteriosa normalização referências desse estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro na realização desse estudo.

*“Ando devagar porque já tive pressa e
levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem
sabe, só levo a certeza de que muito
pouco eu sei ou nada sei.”*

Almir Sater

RESUMO

Souza RMC. Microrrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2019.

Rearranjos cromossômicos submicroscópicos representam uma das causas de quadros clínicos complexos de anomalias congênitas, incluindo alterações craniofaciais, anomalias cardíacas, distúrbios de crescimento e de desenvolvimento, entre outras. O estudo mais minucioso desses microrrearranjos cromossômicos e dos fenótipos a eles relacionados têm permitido a identificação de locos e de genes relacionados às anomalias específicas dentro do espectro fenotípico das síndromes de microdeleção ou microduplicação. O objetivo deste estudo foi analisar regiões cromossômicas subteloméricas e de um grupo de síndromes de microdeleção ou microduplicação conhecidas, por meio da técnica de MLPA (P036 e P064, respectivamente, em uma amostra de indivíduos brasileiros com fissuras labiopalatinas associadas a múltiplas anomalias congênitas, com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala, sem diagnóstico sindrômico estabelecido e com cariótipo normal, pertencentes à casuística do HRAC/USP, a fim de contribuir para o diagnóstico e melhor compreensão do fenótipo, auxiliar na identificação de novos genes candidatos às anomalias craniofaciais, na conduta terapêutica e no aconselhamento genético às famílias. Os dados obtidos demonstraram que 11,5% dos indivíduos avaliados nesse estudo apresentaram rearranjos submicroscópicos, incluindo del16p, del18q, dup11p, dup16q, del22q11.2 e dupXp22.33/Yp11.2. A definição diagnóstica, nesse grupo de indivíduos, permitiu auxiliar no melhor manejo do indivíduo, na prevenção de complicações e no aconselhamento genético adequado. Como limitação desse estudo destaca-se o fato da técnica de MLPA não permitir a definição do tamanho e da posição dos pontos de quebra dos rearranjos cromossômicos, dificultando a completa correlação genótipo/fenótipo.

Descritores: Anomalia craniofacial. Testes genéticos. Anomalias cromossômicas.

ABSTRACT

Souza RMC. Submicroscopic chromosomal rearrangements in complex craniofacial syndromes [thesis]. Bauru: Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies (HRAC), University of São Paulo; 2019.

Submicroscopic chromosomal rearrangements represent one of the causes of complex clinical conditions of congenital anomalies, including craniofacial anomalies, congenital heart defects, growth and developmental disorders, among others. The more detailed study of these chromosomal microarrays and related phenotypes has allowed the identification of genes and locos related to the specific anomalies within the phenotypic spectrum of the microdeletion or microduplication syndromes. The goal of this study was to analyze subtelomeric chromosomal regions and a distinct subset of microdeletion or microduplication disorders using the MLPA technique (P036 and P064, respectively), in a sample of Brazilian individuals with cleft lip and palate associated with multiple congenital anomalies, developmental delay and/or speech acquisition delay, without syndromic diagnosis in order to contribute to the diagnosis and better understanding of the phenotype, to assist in the identification of new genes that are candidates for craniofacial anomalies, in the therapeutic management and in the genetic counseling of the families. The data obtained showed submicroscopic rearrangements in 11,5% of the individuals evaluated, including del 16p, del 18q, dup11p, dup16q, del22q11.2 and dup Xp22.33/Yp11.2. The diagnostic delineation in this cohort could be help in the better management of the individual, in the prevention of complications and in the adequate genetic counseling. The limitation of this study is the unspecified of MLPA technique by definition of the size and position of the breakpoints of chromosomal rearrangements, hindering the complete genotype/phenotype correlation.

Keywords: Craniofacial abnormalities. Genetic testing. Chromosome aberrations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Novas síndromes de microdeleção e microduplicação descobertas entre 2009 e 2014	30
Figura 2 - Teste MLPA mostrando um resultado normal, com as sondas localizadas no intervalo entre 0,7 e 1,3.....	43
Figura 3 - Aspecto facial dos indivíduos da casuística	60-61
Figura 4 - Aspectos faciais do indivíduo 24.....	64
Figura 5 - Indivíduo 24. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e as duplicações (quadrados vermelhos) das sondas RIC8A na região 11p15.5 e GAS8 na região 16q24.3	64
Figura 6 - Localização genômica da sonda MLPA RIC8A na região 11p15.5 (GRCh38, hg38).....	65
Figura 7 - Localização genômica da sonda MLPA GAS8 na região 16q24.3 (GRCh38, hg38).....	65
Figura 8 - Aspectos faciais do indivíduo 30.....	68
Figura 9 - Indivíduo 30. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e a deleção da sonda POLR3K (quadrado vermelho) na região 16p13.3	69
Figura 10 - Localização genômica da sonda MLPA POLR3K na região 16p13.3 (GRCh38, hg38).....	69
Figura 11 - Aspectos faciais do indivíduo 33.....	71
Figura 12 - Indivíduo 33. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes), a duplicação da sonda SHOX (Xp22.33/Yp11.2) (quadrado vermelho acima da linha verde) e a deleção da sonda RBFA (18q23) (quadrado vermelho abaixo da linha verde)	72

Figura 13 - Localização genômica das sondas MLPA SHOX (Xp22.33) (GRCh38, hg38).....	72
Figura 14 - Localização genômica das sondas MLPA SHOX (Yp11.2) (GRCh38, hg38).....	72
Figura 15 - Localização genômica das sondas MLPA RBFA (18q23) (GRCh38, hg38).....	72
Figura 16 - Aspectos faciais do indivíduo 36.....	77
Figura 17 - Localização genômica do F7. Bandas de acordo com o Ensembl.....	77
Figura 18 - Indivíduo 36. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e a duplicação da sonda F7 (quadrado vermelho) na região 13q34.....	78
Figura 19 - Gráfico da análise MLPA P064 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas na região 22q11 (a). Quadrados verdes representam as sondas sem alteração (duas cópias do gene) e os quadrados vermelhos, a deleção das sondas DGCR8, CLTCL1, ZNF74, GNB1L, SNAP29, MED15, CDC45 (uma cópia do gene). A figura à esquerda (b) representa a confirmação da deleção por meio da análise MLPA P250 (sondas DGCR8, HIRA, TBX1_1, CLTCL1, CLDN5, ZNF74, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, MED15, 10p14.4, SNAP29, LZTR1, CDC45L) (quadrados vermelhos).....	80
Figura 20 - Localização genômica da região 22q11.2 (chr22:20,982,013-20,999,038). Bandas de acordo com o UCSC.....	80
Figura 21 - Aspectos faciais do indivíduo 41, aos 4 anos de idade.....	81
Figura 22 - Aspectos faciais do indivíduo 46.....	82
Figura 23 - Aspectos faciais do indivíduo 20.....	86
Figura 24 - Localização genômica do gene FMR1 (chrX:147,909,431-147,911,817). Bandas de acordo com o UCSC.....	86
Figura 25 - Aspectos faciais do indivíduo 48.....	91

Figura 26 - Localização genômica da região deletada (chrX:140,353,243-140,779,447). Bandas de acordo com o UCSC**91**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Dados gestacionais e perinatais, antecedentes pessoais e familiares e sinais clínicos da casuística	49-59
Quadro 2 - Alterações encontradas em seis indivíduos da casuística, incluindo a região das CNVs, tipo de CNV e as sondas MLPA	62
Quadro 3 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 24, região cromossômica e sonda MLPA	64
Quadro 4 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 30, região cromossômica e sonda MLPA	68
Quadro 5 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 33, região cromossômica e sonda MLPA	71
Quadro 6 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 36, região cromossômica e sonda MLPA	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADNPM	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribunucleico complementar
CGHarray	Hibridização Comparativa de Genomas em array
ClinVar	Banco de variantes genômicas
cm	Centímetros
CNV(s)	Variação(ões) de número de cópias de DNA; do inglês: Copy Number Variation
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
del	Deleção
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Ácido desoxirribunucleico
dup	Duplicação
ECARUCA	European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations
EN	Estatura ao nascimento
F	Feminino
FISH	Hibridização in Situ Fluorescente
FL/P	Fissura de lábio e palato
FP	Fissura de palato
G	Guanina
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IMC	Idade materna na concepção
IPC	Idade paterna na concepção
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
Kb	Kilobase(s)
M	Masculino
Mb	Megabase(s)
ml	Mililitros(s)

MLPA	Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	Nacional Institutes of Health
nt	Nucleotídeo(s)
P	percentil
p	Braço curto do cromossomo
PAR	Região(ões) pseudoautossômica(s)
pb	Par(es) de base(s)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PN	Peso ao nascimento
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
q	Braço longo do cromossomo
SGCBM	Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular
SR	Sequência de Robin
T	Timina
UCSC	University California Santa Cruz
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA	37
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	39
3.2	CASUÍSTICA.....	39
3.3	METODOLOGIA	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	DADOS CLÍNICOS	48
4.2	ANÁLISE MLPA	62
4.2.1	Descrição clínica e análise MLPA dos seis indivíduos com variações de número de cópias.....	63
4.2.2	Descrição clínica e análise MLPA dos indivíduos 41 e 46	79
4.3	INDIVÍDUOS COM MLPA P036 E P064 NORMAIS QUE TIVERAM EXAMES ADICIONAIS ALTERADOS, POSTERIORES A ANÁLISE DE MLPA DESSE ESTUDO	85
5	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES	125
	ANEXO	139

*1 INTRODUÇÃO E
REVISÃO DE LITERATURA*

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento craniofacial é um processo morfogenético tridimensional complexo, altamente orquestrado, envolvendo centenas de genes que controlam a padronização coordenada, a diferenciação e a proliferação de tecidos de múltiplas origens embrionárias (TWIGG; WILKIE, 2015; XAVIER et al., 2016). Distúrbios no desenvolvimento normal do crânio durante a embriogênese podem manifestar-se em malformações que afetam as estruturas do crânio (ossos e sistema nervoso central) e as estruturas orofaciais (KOUSKOURA et al., 2011; RENKEMA et al., 2018).

As anomalias craniofaciais representam mais de um terço das anomalias congênitas (TWIGG; WILKIE, 2015) e, entre elas, as fissuras orofaciais, as quais incluem a fissura de lábio com ou sem envolvimento do palato (FL/P) e a fissura de palato (FP), são as mais frequentes (VANDERAS, 1987; JONES, 1988; CROEN et al., 1998; TOLAROVÁ; CERVENKA, 1998; SCHUTTE; MURRAY, 1999; GORLIN; COHEN; HENNEKAM, 2001; JIANG; BUSH; LIDRAL, 2006; MOSSEY et al., 2009; GUNDLACH; MAUS, 2006; SILVA; FREITAS, 2007; JEHEE et al., 2009; JUGESSUR; FARLIE; KILPATRICK, 2009; HENNEKAM; KRANTZ; ALLANASON, 2010; DIXON et al., 2011; IPDTC WORKING GROUP, 2011; DORAY et al., 2012; FREITAS et al., 2012; MAARSE et al., 2012; SHI et al., 2012; WATKINS et al., 2014; KOGA et al., 2016), afetando 1 em cada 700 nascidos vivos (DIXON et al., 2011; CROCKETT; GOUDY, 2014) e podendo ocorrer de forma isolada ou associada a outras anomalias (ALTUNHAN et al., 2012; PAASKE; GARNE, 2018). Embora a FL/P e a FP sejam os tipos mais comuns de fissura orofacial, há outras formas raras que afetam outras estruturas craniofaciais, como por exemplo, a mandíbula, o lábio inferior, a comissura labial, o terço médio superior da face, a região nasal, ocular e até mesmo a região craniana (TESSIER, 1976; MAZZOLA; MAZZOLA, 2014; FIJAŁKOWSKA; ANTOSZEWSKI, 2015). Essas fissuras raras também podem ocorrer de forma isolada ou como parte do espectro clínico de síndromes raras (GUION-ALMEIDA; RICHIERI-COSTA, 2001; FERRERO et al., 2010; CONTE et al., 2016; DAI et al., 2016).

Etiologicamente, a FL/P é considerada distinta da fissura de palato (FP) isolada, devido a diferenças relativas ao desenvolvimento embriológico, prevalência,

fatores de risco, e associações com outras anomalias congênicas (FOGH-ANDERSEN, 1942; COHEN JR, 2006; LUIJSTERBURG; VERMEIJ-KEERS, 2001, 2011; MAARSE et al., 2012). Cerca de 50% das FP (SHPRINTZEN et al., 1985; JUGESSUR; MURRAY, 2005; BURG et al., 2016) e 30% das FLP ocorrem em associação a outras anomalias congênicas, sendo parte do espectro clínico de uma ampla variedade de síndromes, incluindo síndromes mendelianas (mais de 500 condições), síndromes resultantes de alterações cromossômicas e síndromes resultantes do efeito de fatores teratogênicos (STANIER; MOORE, 2004; JUGESSUR; FARLIE; KILPATRICK, 2009; DIXON et al., 2011; KOUSKOURA et al., 2011; MAARSE et al., 2012; MARAZITA, 2012; LESLIE; MARAZITA, 2013; WICHAJARN et al., 2014; LESLIE et al., 2015; ABDOLLAHI FAKHIM; SHAHIDI; LOTFI, 2016; BURG et al., 2016; BASHA et al., 2018).

As alterações cromossômicas, em sua maioria, resultam em condições com defeitos no desenvolvimento de múltiplos sistemas que frequentemente incluem alterações craniofaciais, distúrbio de crescimento e deficiência intelectual, podendo ser a causa de abortos recorrentes (ROSENBERG et al., 2000; SHAFFER; LUPSKI, 2000; CALISKAN et al., 2005; SHAO et al., 2008; TOS et al., 2012; WECKSELBLATT; RUDD, 2015). Por vezes, alterações no número ou na estrutura dos cromossomos são responsáveis pela ocorrência de fissura orofacial sindrômica (HENNEKAM; KRANTZ; ALLANASON, 2010). Em algumas situações são observados rearranjos complexos em indivíduos com múltiplas anomalias congênicas (ALESI et al., 2017; SCHLUTH-BOLARD et al., 2019). Rearranjos cromossômicos complexos são anomalias estruturais envolvendo mais de duas quebras de cromossomos com trocas de segmentos cromossômicos, sendo, em sua maioria, resultado de translocações que levam à formação de cariótipos muito complexos e de difícil interpretação. O rearranjo complexo mais comumente descrito é o que envolve três cromossomos que se quebram e trocam segmentos cromossômicos (PELLESTOR et al., 2011; GATINOIS et al., 2014; ALESI et al., 2017; FRUMKIN et al., 2017). Estes são eventos raros, que podem ser herdados ou ocorrem “*de novo*”, sendo este último responsável por 70-75% dos casos e podem ocorrer em células somáticas ou germinativas. Os rearranjos complexos são frequentemente observados em células tumorais (células somáticas), particularmente associados a malignidades hematológicas (GOUMY et al., 2006; DE

BRAECKELEER et al., 2010; PELLESTOR et al., 2011). Dados da literatura mostram, ainda, que cerca de 70% dos rearranjos complexos detectados em indivíduos fenotipicamente normais são equilibrados e representam casos familiares, 20-25% dos rearranjos complexos são detectados em indivíduos com anomalias congênitas e/ou deficiência intelectual e 5-10% são detectados durante o diagnóstico pré-natal (DE GREGORI et al., 2007; PELLESTOR et al., 2011). Raramente os rearranjos complexos são descritos em indivíduos com distúrbios psiquiátricos (PELLESTOR et al., 2011).

Deleções e duplicações cromossômicas, presentes no genoma humano, muitas vezes estão localizadas em regiões ricas em repetições como telômeros, centrômeros e heterocromatina (FREEMAN et al., 2006). Os telômeros, as extremidades dos cromossomos, são regiões ricas em repetições TG (TTAGGG)*n em tandem*, variando entre 5 kb e 15 kb de extensão e que se repetem de várias centenas a milhares de vezes (SACCONE et al., 1982; BLASCO; GASSER; LINGNER, 1999; MEFFORD; TRASK, 2002; SACCONE et al., 2002; YATSENKO et al., 2012). Adjacentes a estas repetições (500 Kb terminais) estão as regiões subteloméricas, que consistem do complexo de famílias de ácido desoxirribonucleico (DNA) repetitivos, extremamente ricas em genes e, frequentemente, envolvidas em rearranjos cromossômicos, incluindo deleções, duplicações, translocações e rearranjos cromossômicos complexos (SACCONE et al., 1982; FLINT et al., 1997; BLASCO; GASSER; LINGNER, 1999; MEFFORD; TRASK, 2002; SACCONE et al., 2002; ROOMS et al., 2004; FREEMAN et al., 2006; LEDBETTER; MARTIN, 2007; SHAO et al., 2008; RIETHMAN, 2009; YATSENKO et al., 2009, 2012; DAMNJANOVIC et al., 2015).

O advento das técnicas de citogenética molecular e, mais recentemente do sequenciamento de nova geração, possibilitou a melhor caracterização de rearranjos cromossômicos em desequilíbrio. Dados recentes mostram que o genoma de dois indivíduos difere em aproximadamente 0,8% das sequências, podendo variar de grandes anomalias cromossômicas microscopicamente visíveis a alterações de um único nucleotídeo. Bancos de dados de variantes genômicas têm catalogado aproximadamente 2,4 milhões de variações de número de cópias de DNA (CNVs; do inglês: Copy Number Variation). Essas são sequências de DNA submicroscópicas (1 Kb a várias 3 Mb), indetectáveis pela análise citogenética clássica. As CNVs

normalmente são herdadas e presentes em indivíduos saudáveis (variante normal na população), representando em torno de 4,8 a 12% da variação do genoma humano (EDELMANN; HIRSCHHORN, 2009; CHRISTOFOLINI et al., 2010; WECKSELBLATT; RUDD, 2015; ZARREI et al., 2015). Elas estão distribuídas em todos os 24 cromossomos, inseridas em 200.000 locos únicos, os quais cobrem 72% do genoma humano, contribuindo para a variação interindividual (WONG et al., 2007; MACDONALD et al., 2014; MÄNNIK et al., 2015; ZARREI et al., 2015). Apesar de sua contribuição para variabilidade genômica humana, por vezes, variações nas CNVs podem afetar os níveis de transcrição, a sequência, a estrutura e/ou a função dos genes. Estas variações patogênicas podem corresponder a deleções, duplicações ou translocações de regiões encontradas nos indivíduos (herdadas ou *de novo*), frequentemente estão associadas a distúrbios complexos e são uma importante causa de atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual, transtorno do espectro do autismo, anomalias congênitas, características dismórficas e suscetibilidade a doenças de etiologia complexa (FREEMAN et al., 2006; WONG et al., 2007; SCHAAF; WISZNIEWSKA; BEAUDET, 2011; RUDD, 2012; SWAMINATHAN et al., 2012; VISSERS; STANKIEWICZ, 2012; WEISE et al., 2012; NEVADO et al., 2014; DAMNJANOVIC et al., 2015; RICCARDI et al., 2015; BUENO et al., 2018).

Dentre as anomalias congênitas causadas por desequilíbrios cromossômicos envolvendo grandes CNVs, as anomalias craniofaciais, incluindo as fissuras orofaciais, estão entre os fenótipos mais comuns (COOPER et al., 2011; MÄNNIK et al., 2015; CONTE et al., 2016).

Consulta e análises integradas que combinam dados de variantes genéticas e fenóticas, são essenciais para análise e compreensão das relações genótipo-fenótipo, para a comparação entre os sinais clínicos dos indivíduos e para associações significativas entre regiões alteradas e fenótipos patológicos. Para auxiliar a caracterização de relações moleculares entre diferentes fenótipos e microvariantes é indispensável aplicar os princípios da “medicina em rede” (do inglês *network medicine*; plataformas para explorar sistematicamente a variante, a doença e o fenótipos aparentemente distintos (BARABÁSI; GULBAHCE; LOSCALZO, 2011) que inclui os dados submetidos e registrados nos Bancos de Dados

genômicos/fenotípicos de caráter público, para encontrar as consequências das variantes e sua associação com doenças em questão (BUENO et al., 2018).

A base de dados DGV (*Database of Genomic Variants*;) (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016) contém dados de variantes genômicas, que envolvem segmentos de DNA maiores que 50pb, identificadas em amostras de indivíduos controle saudáveis (variantes polimórficas). O banco de dados é continuamente atualizado, à medida que novos estudos são realizados e revisados por pares (MACDONALD et al., 2014). Já a DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) fornece os registros das variantes genômicas e fenótipos associados, com dados de mais de 29.380 indivíduos com alteração genômica de baixa prevalência (FIRTH et al., 2009) coletados de mais de 200 instituições ao redor do mundo. A maioria dos indivíduos com CNVs registrados apresentam distúrbios pediátricos relacionados ao atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual ou a perfis fenotípicos patológicos (FIRTH et al., 2009; SWAMINATHAN et al., 2012; BRAGIN et al., 2014; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2014; BUENO et al., 2018).

Outra base de dados destinada a registrar variações genômicas relacionadas à saúde humana é a ClinVar (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a). Essa base de dados fornece informações sobre a variação genômica e sua relação (ou não) com fenótipos humanos. Se a variação descrita não pode ser relacionada ao fenótipo, ela é classificada como benigna ou provavelmente benigna. Se não há subsídios suficientes para relacioná-la ao fenótipo em estudo, ela é classificada como variação de significado incerto. E se a variação é fortemente indicativa de estar causando o fenótipo ou conhecidamente causando o fenótipo ela é classificada como provavelmente patogênica ou patogênica, respectivamente. Dados como a localização genômica, tipo de variação, tamanho e complexidade das variantes, consequência molecular, tipos de métodos utilizados e evidências de apoio (dados de vários estudos e/ou estudo funcional) sobre variações genômicas também são disponibilizados nessa base de dados (RICHARDS et al., 2015; FAMIGLIETTI et al., 2019).

Dados do Projeto Internacional do Genoma Humano, os quais foram destinados ao se produzir e anotar a sequência de referência do genoma humano, estão disponibilizados em diversas ferramentas da web, tais como UCSC Genome Browser (KENT et al., 2002; CASPER et al., 2018; UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018), Ensembl (HUBBARD et al., 2002; HUNT et al., 2018; WELLCOME GENOME CAMPUS, 2019) e no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018b), uma divisão da Biblioteca Nacional de Medicina, localizada no campus do Instituto Nacional de Saúde, em Bethesda nos Estados Unidos (National Institutes of Health, NIH). Esses navegadores fornecem dados da localização e estrutura de genes (incluindo o cDNA), fenótipos relacionados, dados da proteína, das variações normais e patogênica, dados de expressão, da homologia com outras espécies, entre outras informações, fazendo a interface entre os diferentes Banco de Dados.

Estudos populacionais sugerem que mais de 99% de todas as CNVs benignas são herdadas e muito menores que 500 kb. A maioria das CNVs patogênicas é maior que 1Mb, e originadas de um evento *de novo*. A maior parte das CNVs raras, de tamanho intermediário (250-500kb), é considerada benigna (MILLER et al., 2010; SWAMINATHAN et al., 2012). CNVs herdadas, tais como aquelas observadas nos cromossomos 1q21.1 (OMIM #612474 e #612475), 3q29 (OMIM #609425 e #611936), 15q13.3 (OMIM #612001), 16p11.2 (OMIM #611913), 22q11.2 (OMIM#188400 e OMIM #608363), entre outras também podem ser patogênicas, mas possuem penetrância incompleta e expressividade variável. As implicações clínicas variáveis podem ser explicadas, ainda, por outros mecanismos de herança que influenciam a expressão gênica como, por exemplo, quando uma deleção hereditária está inserida em região imprintada ou quando há um alelo recessivo patogênico, na mesma região do cromossomo homólogo (MILLER et al., 2010).

Durante muitos anos o cariótipo de banda G (nível de 400 a 550 bandas e resolução de 5-10 Mb) foi o recurso mais utilizado para o diagnóstico das anomalias cromossômicas e, embora, algumas vezes, possa detectar desequilíbrios genômicos tão pequenos quanto 3 Mb, muitas vezes pode não detectar desequilíbrios genômicos entre 5-10 Mb, dependendo da região genômica envolvida e/ou das

condições do ensaio (DAVE; SANGER, 2007; MILLER et al., 2010; MONTEIRO et al., 2017). Esse nível de resolução limita a identificação de pequenas deleções e duplicações responsáveis por alguns quadros genéticos com alterações cromossômicas submicroscópicas tais como as síndromes: deleção 1p (1p36) (SHAPIRA et al., 1997; HEILSTEDT et al., 2003; SEO et al., 2016), de Williams-Beuren (7q11) (WILLIAMS; BARRATT-BOYES; LOWE, 1961; BEUREN et al., 1964; MORRIS et al., 2019), de Langer-Giedion (8q24) (GIEDION, 1967; CHEN et al., 2015), Rubinstein-Taybi (16p13) (RUBINSTEIN; TAYBI, 1963; CALÌ et al., 2013), Smith-Magenis (17p11) (SMITH et al., 1986; DUBOURG et al., 2014), Miller-Dieker (17p13) (MILLER, 1963; DIEKER et al., 1969; CHEN et al., 2013), Alagille (20p12) (ALAGILLE et al., 1987; SALEH; KAMATH; CHITAYAT, 2016), Velocardiofacial (22q11) (SHPRINTZEN et al., 1981; SCAMBLER et al., 1992; MLYNARSKI et al., 2016), de Phelan-McDermid (22q13) (PHELAN; ROGERS; STEVENSON, 1988; XU et al., 2016) entre outras (CARPENTER, 2001; BALIKOVA et al., 2007, SHINAWI; CHEUNG, 2008; XU et al., 2014). Com o avanço do conhecimento genômico, outras técnicas moleculares com hibridização de sondas específicas e nível maior de resolução, como a hibridização in situ fluorescente (FISH) e a hibridização comparativa de genomas em array (CGHarray), foram disponibilizadas (JOYCE et al., 2001; ROOMS; REYNIERS; KOOY, 2005), mas o alto custo dos exames tem limitado sua utilização em larga escala pelos laboratórios de rotina. Mais recentemente, o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração tem contribuído consideravelmente para a identificação de rearranjos cromossômicos submicroscópicos (menores que 3 Mb) responsáveis por quadros sindrômicos de microdeleções e microduplicações.

A análise de CNVs é atualmente indicada como primeiro nível de teste diagnóstico clínico em indivíduos com atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, transtornos do espectro do autismo e anomalias congênitas múltiplas. Além disso, a análise da CNV genômica também é uma ferramenta útil na identificação de novos genes ou locos associados a doenças genéticas (CORREA et al., 2018).

A técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) permite detectar alterações menores que 1 Mb em regiões específicas do genoma (SCHOUTEN et al., 2002; POHOVSKI et al., 2013). A MLPA permite a

triagem genômica quantitativa de sequências específicas e baseia-se na hibridação e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de mais de 45 sondas em uma única reação (SCHOUTEN et al., 2002; ZANARDO, 2014) e, tem sido utilizada para detectar CNVs, microdeleções e microduplicações cromossômicas, alterações subteloméricas, deleções e duplicações intragênicas, detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ou mutações de ponto e detecção de regiões metiladas no genoma (MRC-HOLLAND, 2019). A MLPA é uma abordagem útil, mas direcionada apenas para confirmação uma suspeita clínica específica ou análise de triagem de regiões cromossômicas (UTINE et al., 2014). A MLPA é um método rápido e simples, sensível e de baixo custo quando comparada à análise por FISH e a hibridização comparativa de genomas em array (CGHarray) (cerca de 7,5 vezes menor que o CGHarray), alta resolução e especificidade (ZANARDO, 2014).

Há, atualmente, 400 kits MLPA (MRC-HOLLAND, 2019) indicados para a investigação de vários distúrbios genéticos e tumores. Para casos de múltiplas anomalias e/ou distúrbios do desenvolvimento e síndromes de microdeleção são indicados kits para as regiões subteloméricas (P036 e P070) e kits específicos para regiões conhecidas (P064, P245, P250, P373, entre outros).

Vários estudos demonstram que a técnica de MLPA é eficaz para triagem de desequilíbrios subteloméricos (KOOLEN et al., 2004; ROOMS et al., 2004, 2006; KIRCHHOFF et al., 2005; NORTHROP et al., 2005; LAM et al., 2006; MONFORT et al., 2006; AHN et al., 2007; BENDAVID et al., 2007; STEGMANN; JONKER; ENGELEN, 2008; CHRISTOFOLINI et al., 2010; KJAERGAARD et al., 2010; JEHEE et al., 2011; VERDU PEREZ et al., 2011; POHOVSKI et al., 2013; BOGGULA et al., 2014; GOUAS et al., 2015; SZCZAŁUBA et al., 2016; MONTEIRO et al., 2017). A utilização dessa técnica tem aumentado a detecção de alterações subteloméricas em 5-10% dos indivíduos com anomalias congênitas cujo cariótipo convencional foi normal (DE VRIES et al., 2003; KOOLEN et al., 2004; KIRCHHOFF et al., 2005; JEHEE et al., 2011; KIM et al., 2015; SZCZAŁUBA et al., 2016; MONTEIRO et al., 2017).

A detecção de CNVs patogênicas em regiões subteloméricas é bastante complicada, pois comparada a outras regiões do genoma, as regiões subteloméricas são ricas em CNVs. Essas variações podem ocorrer também em indivíduos saudáveis e, o efeito de uma deleção e/ou duplicação dependerá do tamanho da

região alterada e dos genes presentes nela. Portanto, nem todas as CNVs identificadas em um indivíduo resultarão em alterações de fenótipo. Assim, torna-se muito importante a escolha criteriosa do kit MLPA para regiões e/ou genes alvo. A combinação de kits MLPA para triagem de desequilíbrios submicroscópicos mais frequentes tem aumentado a capacidade diagnóstica da técnica em 70% (JEHEE et al., 2008, 2011; CHEN et al., 2014; SANTA MARÍA et al., 2016). Para investigação de rearranjos subteloméricos são indicados os kits P036 e P070, e é recomendável utilizar dois desses kits para maximizar a taxa de detecção (MRC-HOLLAND, 2019).

Jehee et al. (2011) utilizaram uma combinação dos kits P036, P069, P070 para a investigação de alterações cromossômicas em indivíduos com anomalias congênitas e atraso neuropsicomotor e identificaram alterações causativas em 20,7% dos 261 indivíduos analisados pela técnica de MLPA, enquanto a realização de cariótipo convencional diagnosticou apenas 6,9% dos indivíduos, demonstrando que a combinação desses 3 kits é um ótimo recurso para a detecção de alterações em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas e deficiência intelectual.

Em caso de resultados positivos é recomendado testar também os pais. Existem kits MLPA, disponíveis no mercado, que possibilitam confirmar e delinear a extensão de deleções/duplicações subteloméricas, os quais contêm sondas específicas para regiões específicas. A confirmação do resultado positivo também pode ser realizada por FISH ou técnicas de custos mais altos, tais como CGHarray ou sequenciamento de genoma inteiro (MRC-HOLLAND, 2019).

Como limitações, a MLPA não permite detectar alterações que se encontram fora da sequência alvo das sondas, permanece a possibilidade de que existam alterações em regiões não cobertas pelas sondas. A técnica também não detecta rearranjos equilibrados, como inversões e translocações. Como a frequência de CNVs é mais elevada nas regiões subteloméricas e nem todas as alterações detectadas pela MLPA subtelomérica são patogênicas, assim as alterações em apenas uma única sonda sempre requerem confirmação por outro método (MRC-HOLLAND, 2019).

Outra técnica de alto nível de resolução utilizada na citogenética molecular para análise de CNVs é CGHarray, que permite identificar rearranjos em desequilíbrio com resolução de 100Kb ou menos, aumentando a sensibilidade em pelo menos 50 vezes comparada ao cariótipo de banda G (DAVE; SANGER, 2007;

SHINAWI; CHEUNG, 2008; FIRTH et al., 2009; HING; MEFFORD; CUNNINGHAM, 2012; UTINE et al., 2014). A técnica tem como princípio a comparação do genoma alvo com um genoma de referência, a fim de identificar diferenças de número de cópias genômicas. Várias plataformas CGHarray foram desenvolvidas e vêm sendo continuamente aperfeiçoadas. Todas as plataformas se baseiam em um princípio comum de detectar alterações no número de cópias comparando uma amostra DNA controle com uma amostra de DNA do indivíduo. As várias plataformas CGHarray incluem entre 400 a milhares de segmentos de DNA locos/chips (DAVE; SANGER, 2007) e são desenvolvidas para detectar aneuploidias, síndromes microdeleções e microduplicações descritas e bem caracterizadas, desequilíbrios cromossômicos subteloméricos e outros rearranjos, bem como mosaicismos cromossômicos de baixa frequência além de vários outros segmentos de DNA que cobrem todo o genoma (DAVE; SANGER, 2007; SHEARER, 2007; SHINAWI; CHEUNG, 2008). A CGHarray e arrays de polimorfismos de nucleotídeo único (SNParrays), juntamente com o sequenciamento de nova geração, são atualmente as abordagens primárias usadas para detecção de CNVs (ZARREI et al., 2015). Embora essas técnicas tenham a vantagem de aumentar a possibilidade diagnóstica, o custo elevado de implantação da técnica e de manutenção dos consumíveis dificulta muito sua utilização em laboratórios de rotina de serviços públicos de saúde.

A taxa de detecção de anomalias cromossômicas em indivíduos com anomalias congênitas e atraso neuropsicomotor sem quadro clínico específico varia de acordo com o teste diagnóstico aplicado: cariótipo 6,9% (JHEE et al., 2011), 8-10% FISH (EDELMANN; HIRSCHHORN, 2009), MLPA 20,7% (JHEE et al., 2011) e CGHarray 25,9% (HOCHSTENBACH et al., 2009). Zanardo (2014) estudando 78 indivíduos com anomalias congênitas associadas ao atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, com cariótipo de banda G prévio normal, encontrou 18,2% de alteração cromossômica utilizando a técnicas de FISH, 34,6% com MLPA e 42,3% com CGHarray. Assim, a técnica de MLPA tem sido considerada uma alternativa eficaz quando CGHarray não está disponível, podendo aumentar o diagnóstico genético de desequilíbrios cromossômicos até quatro vezes em relação ao cariótipo (JEHEE et al., 2011; MONTEIRO et al., 2017).

A varredura de todo o genoma por meio de técnicas moleculares, forneceu a oportunidade de descobrir doenças associadas às CNVs, sem o conhecimento

prévio da possível localização cromossômica. Tem sido descrito um acúmulo de CNVs em indivíduos maior que a média da população que pode ser a chave para compreender fenótipos complexos. Muitas CNVs, mostram um rearranjo altamente complexo de uma região genômica, demonstrando ganho e perda de material a cada geração, que podem envolver genes inteiros, porções de genes, múltiplos de genes contíguos, elementos reguladores, ou nenhum dos itens acima, e a natureza e a extensão do material que é deletado ou duplicado é importante para as consequências fenotípicas (LEE; SCHERER, 2010). A identificação de novas síndromes baseia-se em características consistentes e clinicamente reconhecíveis associadas uma região cromossômica comum. No entanto, a variabilidade na penetrância e expressão das manifestações clínicas de algumas CNVs, tem complicado o estabelecimento do seu significado clínico (NEVADO et al., 2014).

Em adição ao aumento na possibilidade diagnóstica, o estudo mais minucioso dos rearranjos cromossômicos e dos fenótipos a eles relacionados tem permitido a identificação de locos gênicos e genes relacionados às anomalias específicas nas síndromes de microdeleção/microduplicação o que tem contribuído de forma expressiva para a compreensão das anomalias craniofaciais complexas, definição do diagnóstico, manejo do indivíduo e a prevenção de complicações e/ou da recorrência por meio do aconselhamento genético (SHAFFER; LUPSKI, 2000; DIXON et al., 2011; NEVADO et al., 2015). Atualmente, é amplamente aceito que as caracterizações genotípicas e fenotípicas dos indivíduos aceleram a identificação de **novas doenças genéticas** e/ou **diferentes subtipos de doença**. No entanto, o diagnóstico preciso de muitos distúrbios genéticos torna-se mais complicado quando os indivíduos apresentam perfis fenotípicos, que compartilham características clínicas de várias síndromes genômicas, ou quando alterações raras afetam um número extremamente baixo de indivíduos. Assim, os principais desafios para os clínicos incluem a interpretação ou classificação de variantes novas ou extremamente raras, a compreensão do fenótipo e as consequências dessas variações genéticas (KÖHLER et al., 2017; BUENO et al., 2018).

O delineamento de novas síndromes pode começar com a identificação de genótipos sobrepostos, isto é, um "primeiro-genótipo", abordagem na qual os indivíduos são caracterizados por uma alteração genômica similar antes de uma apresentação clínica comum ser delineada. Isso é chamado de "genética reversa".

Esta abordagem tem provado ser bem-sucedida considerando a crescente lista de síndromes de microdeleção/microduplicação que foram descritas nos últimos anos. Curiosamente, a maioria destas síndromes tem características fenotípicas que são semelhantes e que se sobrepõem a outras síndromes genéticas descritas (NEVADO et al., 2014, 2015; TENORIO et al., 2014). Além disso, a coleta de informações clínicas e genéticas em bancos de dados como DECIPHER (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018), ISCA (INTERNATIONAL STANDARDS FOR CYTOGENOMIC ARRAYS, 2018), ECARUCA (EUROPEAN CYTOGENETICISTS ASSOCIATION REGISTER OF UNBALANCED CHROMOSOME ABERRATIONS, 2018) e outros bancos de dados gratuitos tem sido crucial para discriminar indivíduos com alterações raras e com novas síndromes de microdeleções/microduplicação (NEVADO et al., 2014). Para exemplificar, na Figura 1 estão dispostas as regiões referentes as novas síndromes de microdeleção/microduplicação descritas entre 2009 e 2014 (NEVADO et al., 2014).

Fonte: NEVADO et al., 2014.

Figura 1 - Novas síndromes de microdeleção e microduplicação descobertas entre 2009 e 2014

Atualmente, a identificação completa do fenótipo como consequências de uma determinada CNV permanece desafiadora. Assim, é necessário que novos avanços significativos sejam alcançados na caracterização das regiões genéticas e dos mecanismos moleculares que controlam a expressão fenotípica (BUENO et al., 2018). Vários estudos têm demonstrado elevada frequência de anomalias cromossômicas submicroscópicas associadas às anomalias craniofaciais sindrômicas e, também, isoladas. Desequilíbrios genômicos em quadros dismórficos incluindo anomalias craniofaciais tais como macrocefalia, fissura de lábio e palato, anomalias oculares e auriculares associados a anomalias do sistema nervoso central, tais como lisencefalia e alterações morfológicas de corpo caloso, foram descritos envolvendo os cromossomos 1, 4, 8, 15, 21, X (ARADHYA et al., 2007). Desequilíbrios envolvendo os cromossomos 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 17 e X têm sido descritos em craniossinostoses (GAJECKA et al., 2005; JEHEE et al., 2005; KARIMINEJAD et al., 2009). Em adição, recentemente Conte et al. (2016), por meio de análise sistemática de CNVs em 312 indivíduos com fissuras orofaciais a partir dos bancos de dados DECIPHER e ECARUCA, identificaram 45 genes em grandes deleções genômicas e 27 genes em duplicações (incluindo os genes *MEIS2*, *FGF2*, *FRZB*, *LETM1*, *SPRY1*, *THBS1*, *TSHZ1*, *TTC28*, *WHSC1*, *WHSC2*, *TULP4* e *MAPK3*), como reguladores do desenvolvimento orofacial ou como potenciais causadores das fissuras orofaciais.

O Hospital de Reabilitação Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) sendo especializado em anomalias craniofaciais, principalmente em um número expressivo de casos com fissura orofacial, possui cadastro informatizado de 10.457 indivíduos com múltiplas anomalias craniofaciais atendidos na Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular do HRAC (SGCBM-HRAC-USP) mostrando que 4,5% (472) dos indivíduos têm causa cromossômica, identificada pela citogenética básica (cariótipo de bandamento G com nível de resolução de 450 bandas). No entanto há na casuística cerca de 35,7% (3.738 indivíduos) dos indivíduos com quadro complexo, sem diagnóstico definido, cuja combinação de sinais clínicos não se enquadra no espectro fenotípico de condições clínicas conhecidas. Uma das possibilidades para explicar esses fenótipos complexos é que, pelo menos em parte, estejam associados a alterações cromossômicas submicroscópicas raras, não visualizadas na citogenética convencional ou no

cariótipo de alta resolução. Estudo prévio realizado por Rodrigues (2010) em uma pequena parcela desse grupo de indivíduos do HRAC o cariótipo de alta resolução (nível de 800 bandas) permitiu identificar rearranjos cromossômicos não detectados pelo exame convencional em 16 indivíduos com anomalias múltiplas associadas ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e sem diagnóstico clínico-genético estabelecido. Essas alterações estavam em regiões cromossômicas mais terminais (teloméricas e subteloméricas), com bandas claras difíceis de serem visualizadas no cariótipo de baixa resolução. Assim, é possível que mais indivíduos com cariótipo normal apresentem alterações em bandas cromossômicas de difícil visualização mesmo utilizando maior resolução (800 bandas).

A implantação de técnica de maior resolução cromossômica que possibilite melhora na eficiência do diagnóstico dos casos com múltiplas anomalias congênitas no HRAC tem sido limitada pelo alto custo da grande maioria dos testes. Diante do exposto, foi realizado o estudo de microrrearranjos em subgrupo de indivíduos da casuística do HRAC com síndromes complexas sem diagnóstico definido, utilizando a técnica de MLPA. A hipótese avultada nesse estudo é que, pelo menos parte desses indivíduos tem fenótipo complexo devido à alteração submicroscópicas. A identificação dessas alterações poderia contribuir não somente para o esclarecimento diagnóstico, mas, ainda, para melhora no manejo do indivíduo, no aconselhamento genético das famílias e, ainda, com a identificação de possíveis genes relacionados à fissura orofacial.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar regiões cromossômicas candidatas às síndromes craniofaciais complexas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar possíveis alterações citogenéticas, por meio da técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala, sem diagnóstico genético-clínico definido e cariótipo de bandamento G prévio normal.
- Estabelecer possível correlação entre o fenótipo dos indivíduos e as regiões cromossômicas alteradas.
- Identificar, quando possível, regiões do genoma relacionadas às fissuras labiopalatinas.
- Fornecer subsídios para a definição e aumento do diagnóstico genético-clínico e, conseqüentemente, para o aconselhamento genético à família.

*3 INDIVÍDUOS ESTUDADOS
E METODOLOGIA*

3 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), CAAE:61744216.6.0000.5441, parecer número 1.905.366 (Anexo A). Os indivíduos e/ou responsáveis somente foram incluídos nesse estudo após serem informados dos objetivos, concordarem em participar do mesmo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndices A e B), quando pertinente, o Termo de Assentimento (Apêndices C e D) e o Termo de Permissão para uso de registros para fins científicos (Apêndice E).

3.2 CASUÍSTICA

Participaram desse estudo 52 indivíduos com fissuras labiopalatinas associadas a múltiplas anomalias congênitas, a atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala, com diagnóstico sindrômico não estabelecido e estudo citogenético convencional prévio normal, dos quais 22 (42,3%) do sexo feminino e 30 (57,7%) do sexo masculino, previamente avaliados por geneticistas clínicos da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular da Divisão de Sindromologia do HRAC-USP-Bauru e cadastrados na Base de Dados da referida Seção. A idade variou de 11 meses a 53 anos.

Os critérios de inclusão foram:

- presença de fissura de lábio e/ou palato e múltiplas anomalias congênitas associadas a atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala;
- diagnóstico sindrômico não estabelecido;
- estudo citogenético convencional prévio normal.

Foram excluídos os indivíduos com múltiplas anomalias com provável etiologia ambiental.

3.3 METODOLOGIA

Enquadraram-se neste estudo indivíduos que preencheram os critérios estabelecidos e concordaram em participar da pesquisa, mediante sua assinatura ou assinatura do responsável do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e, quando pertinente, o Termo de Assentimento. A seguir, foram submetidos à avaliação genético-clínica com geneticistas clínicos da equipe de pesquisa da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular da Divisão de Sindromologia do HRAC-USP-Bauru, para atualização dos dados clínicos. Esta atualização incluiu entrevista com o participante da pesquisa ou seu responsável para a coleta dos dados pessoais (incluindo dados gestacionais, intercorrências neonatais, problemas de saúde, desenvolvimento neuropsicomotor, entre outros) dados referentes à história familiar e à evolução geral do participante e dados antropométricos. Resultados de exames complementares e avaliações de outras especialidades foram obtidos por meio da análise de prontuários do indivíduo, quando necessário. Em seguida os indivíduos foram encaminhados ao Laboratório de Genética e Citogenética Humana - HRAC-USP, Bauru, onde foi coletada uma amostra de sangue periférico (3 ml), do participante e, quando possível, de seus pais, em seringa, por meio de venipunção, para análise citogenética molecular.

A extração de DNA genômico foi realizada por meio do kit de extração de DNA FlexiGene DNA Kit 250, QIAGEN, de acordo com protocolo do fabricante. A quantificação da concentração do DNA foi determinada por meio de espectrofotômetro Nanodrop®ND 1000 UV-Vis.

A técnica de MLPA foi realizada segundo orientações do fabricante (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Para a investigação de cada indivíduo foram utilizados os kits comerciais. O kit SALSA MLPA®P036 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) detecta a presença de deleções e/ou duplicações nas regiões subteloméricas, alterações consideradas como potenciais causas de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, características dismórficas, anomalias congênitas

e perdas gestacionais. Já o kit SALSA MLPA[®]P064 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) investiga as regiões do genoma associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação conhecidas, as quais incluem deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento.

O SALSA MLPA[®]P036 (MRC-HOLLAND, 2019a) contém 47 sondas MLPA, com produtos de amplificação entre 118 e 483 nucleotídeos (nt): duas sondas para cada cromossomo e uma sonda para o cromossomo Y. Dessas, 41 estão localizadas em regiões subteloméricas. Não estão presentes sondas para as regiões subteloméricas dos braços curtos (p) dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22. Para estes, além da sonda subtelomérica dos braços longos, há inclusão de uma sonda extra para detectar a região próxima ao centrômero no braço longo (q). As sondas para os cromossomos X e Y detectam sequências nas regiões pseudoautosômicas (PAR1 e PAR2) que são idênticas nos cromossomos X e Y. Contém ainda, nove fragmentos de controle de qualidade, gerando produtos de amplificação entre 64 e 105 nt: quatro fragmentos de quantificação de DNA (Q-fragmentos), três fragmentos de controle de desnaturação de DNA (D-fragmentos), um fragmento específico para o cromossomo X e outro para o Y. O SALSA MLPA[®]P064 (MRC-HOLLAND, 2019b) contém 52 sondas MLPA, para 15 diferentes síndromes de microdeleção, com produtos de amplificação entre 130 e 483 nt: duas sondas para Síndrome da deleção 1p (1p36); quatro para Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16); cinco para Síndrome de Cri Du Chat (5p15); três para Síndrome de Sotos (5q35); três para Síndrome de Williams (7q11); duas para Síndrome de Saethre-Chotzen (7p21); três para Síndrome de Langer-Giedion – (8q24); três para Síndrome WAGR (tumor de Wilm, aniridia, anomalias geniturinárias e deficiência intelectual) (11p13); três para Síndrome de Prader-Willi/Síndrome de Angelman (15q11); duas para Síndrome de Rubinstein-Taybi (16p13); quatro para Síndrome de Smith-Magenis (17p11); quatro para Síndrome de Miller-Dieker (17p13); duas para Síndrome de Alagille (20p12); sete para Síndrome de DiGeorge (Velocardiofacial) (22q11) e duas para Síndrome de Phelan-McDermid (22q13). Contém ainda, nove fragmentos de controle de qualidade, gerando produtos de amplificação menores que 120 nt: quatro fragmentos de quantificação de DNA (Q-fragmentos), três fragmentos de controle de desnaturação de DNA (D-fragmentos), um fragmento específico para o cromossomo X e outro para o Y.

Quando uma alteração foi detectada, a reação foi repetida em um novo experimento para confirmar o resultado e, ainda, quando possível foram incluídas amostras dos pais para determinar o padrão de herança familiar. Para confirmação de alterações detectadas pelo kit P064, foi realizado novo experimento com o kit P250, específico para alterações no 22q11.2, que contém mais sete sondas específicas para a região 22q11.2 além das outras sete presentes no P064.

O SALSA MLPA[®]P250 (MRC-HOLLAND, 2019c) contém 48 sondas MLPA, com produtos de amplificação entre 129 e 487 nt para detectar deleções ou duplicações na região 22q11.2, que são causa das Síndromes de deleção/duplicação 22q11.2, respectivamente. Além disso, contém sondas para detectar variação do número de cópias nas regiões 4q, 8p, 9q, 10p, 17p e 22q13 como causa da síndrome de DiGeorge (SDG), SDG tipo II ou quadros com características fenotípicas da SDG associados a essas regiões. Contém ainda, nove fragmentos de controle de qualidade, gerando produtos de amplificação entre 64 e 105 nt: quatro fragmentos de quantificação de DNA (Q-fragmentos), dois fragmentos de controle de desnaturação de DNA (D-fragmentos), um fragmento de referência específico para o cromossomo X e outro para o Y.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular do HRAC-USP. As reações de MLPA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante utilizando o termociclador ABI Veriti (Applied Biosystems[®], Foster City, CA) e os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar em um analisador automático ABI 3500 Genetic Analyzer[®] (Applied Biosystems[®], Foster City, CA), com capilar de 50 cm e polímero POP7 TM (Applied Biosystems).

A análise dos dados gerados da leitura no ABI, em arquivos com extensão fsa, foi realizada no programa Genemarker[®] (SoftGenetics[®], genotyping software, State College, Pensilvânia, EUA). O resultado final da análise gerou um gráfico da relação das áreas dos picos de interesse para os indivíduos avaliados em comparação com os picos dos controles da reação (DNAs conhecidamente sem alteração) e uma tabela de número de cópias genômicas para o grupo de sondas utilizadas no kit específico. Resultados foram considerados alterados quando o pico relativo foi menor do que 0,7 (deleção) ou maior do que 1,3 (duplicação), conforme demonstrado na Figura 2.

a=normal; b= deleção, sondas abaixo de 0,7; c= duplicação, sondas acima de 1,3.

Figura 2 - Teste MLPA mostrando um resultado normal, com as sondas localizadas no intervalo entre 0,7 e 1,3

Para análise de significância das alterações encontradas, as alterações (CNVs) foram verificadas na base dados DGV (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016) para verificação de variantes raras e excluir as variantes com frequência maior que 1% na população. Posteriormente, outra base de dados consultada foi a CLINVAR (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a) para consultar as variantes detectadas e classificá-las como uma variante patogênica, provavelmente patogênica, benigna, provavelmente benigna ou de significância incerta. Para a comparação das CNVs encontradas com variantes genômicas e fenótipos associados descritos, este estudo fez uso de dados gerados pela comunidade DECIPHER (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018). Após a verificação das alterações nas bases de dados, quando a variação detectada não pode ser relacionada ao fenótipo, ela foi classificada como variante benigna ou provavelmente benigna. Quando não foram encontrados subsídios suficientes para relacioná-la ao fenótipo em estudo, ela foi classificada como uma variante de significado incerto. E quando a variação foi fortemente indicativa de estar causando o fenótipo ou conhecidamente causando o fenótipo ela foi classificada como provavelmente patogênica ou patogênica, respectivamente.

Quando os indivíduos da casuística realizaram, em outros serviços de saúde, exames com maior nível de resolução (em comparação ao MLPA) ou específicos para determinadas condições, posteriores aos testes MLPAs propostos neste estudo, os dados obtidos foram considerados para o diagnóstico e descritos

separadamente, no entanto, foram excluídos da frequência de diagnóstico do estudo, por não terem sido determinados pelo emprego da técnica de MLPA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da casuística está disposta no item 4.1 no Quadro 1.

A análise de microrrearranjos utilizando o Kit de MLPAP064 foi realizada em todos os indivíduos da casuística. Para o kit de MLPA P036, não foi possível obter resultados para os indivíduos 18, 43, 45, 46, 48,49, 50, 51 e 52, devido a dificuldades de padronização desse kit e a consequente falta de reagentes para finalização dos testes. Ainda, devido à dificuldade de obtenção de recursos para a compra de reagentes, não foi possível confirmar os microrrearranjos observados nos indivíduos 24, 30, 33 e 36, utilizando o Kit P070, conforme recomendação da literatura. Para os indivíduos 41 e 46, a alteração encontrada foi confirmada utilizando o kit MLPA P250, específico para região alterada (conforme descrito no subitem 4.2.2).

A técnica de MLPA permitiu identificar microrrearranjos em 11,5% dos indivíduos com múltiplas anomalias congênicas sem diagnóstico definido selecionados nesse estudo. É importante notar que indivíduos com *gestalt* facial característico de síndromes de microdeleção mais comuns na casuística do HRAC, tais como síndrome velocardiofacial (OMIM#192430) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 1995a) e síndrome Wolf-Hirschhorn/Pitt-Rogers-Danks syndrome (OMIM#194190) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 1995b) não foram incluídos nesse estudo por apresentarem diagnóstico sindrômico definido pela clínica, pela citogenética e pelo teste molecular. Como limitação esta técnica não permite detectar alterações que se encontram fora da sequência alvo das sondas, bem como o tamanho da deleção/duplicação. Assim, permanece a possibilidade de que os fenótipos complexos estejam relacionados às alterações em regiões não cobertas pelas sondas. Os dados clínicos e moleculares dos indivíduos estão apresentados nos subitens 4.1 e 4.2 respectivamente.

O teste MLPA P036 identificou rearranjos cromossômicos em quatro indivíduos (9% da casuística) (indivíduos 24, 30, 33 e 36). Os rearranjos foram considerados patogênicos ou possivelmente patogênicos e, como consequência, em três deles (indivíduo 24, 30 e 33) podem estar influenciando o fenótipo.

Já o teste MLPA P064 identificou deleções na região 22q11.2 em dois indivíduos com fenótipo não clássico da síndrome da deleção 22q11.2 (indivíduos 41 e 46). Os dados clínicos e moleculares desses indivíduos foram dispostos no subitem 4.2.2.

Os indivíduos 20 e 48, com resultados dos exames de MLPA P036 e P064 normais, tiveram oportunidade de realizar testes citogenéticos moleculares, posteriores aos resultados obtidos no presente estudo (PCR sensível a metilação e triplet-primed PCR para o cromossomo X-Frágil por e CGHarray), respectivamente. Os dados clínicos, resultados dos exames e estudo de caso foram dispostos no subitem 4.3.

4.1 DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos de todos os indivíduos incluídos nesse estudo estão dispostos no Quadro 1. O aspecto facial de cada indivíduo está representado na Figura 3.

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
1	F	2a11m	Gestação: sem intercorrências, parto cesáreo. Histórico familiar: - mãe com cabelos grisalhos aos 28 anos, dentes esparsos, canino pontiagudo, agenesia dentária, orelhas proeminentes. - meia irmã materna, filha de pais consanguíneos com hipoglicemia congênita, anomalia do trato intestinal, ADNPM, problemas de fala não especificados e distúrbio de comportamento.	Microtrigonocefalia, sobrancelhas arqueadas, lábio superior fino, rima bucal discretamente inclinada para baixo, FP, cardiopatia congênita, fôvea coccígena, ADNPM e suspeita de puberdade precoce (telarca aos 14m e pubarca aos 21m).	nc
*2	M	13a	Gestação: sem intercorrências, parto cesáreo. PN: 3.101 g IMC: 36a; IPC: 38a Histórico familiar: recorrência do fenótipo em irmão com SR, dificuldade escolar, ADNPM, atraso de fala (indivíduo 31). - mãe com baixa estatura, estrabismo divergente e mãos pequenas; - pai com baixa estatura, lábio superior em “bico”, mãos pequenas, dígitos curtos.	Frontal estreito, implantação baixa de cabelos na fronte, padrão facial atípico (sobrancelhas grossas e arqueadas, fendas palpebrais estreitas, fâcies arredondado) FP, ADNPM, atraso na aquisição da fala, dificuldades de aprendizagem e distúrbios de comportamento.	nc
3	F	12a	Gestação: sem intercorrências, parto normal, a termo, cianose.	Baixa estatura, implantação anômala de cabelos na fronte (cabelos varridos para trás), estreitamento na região lateral do frontal, sobrancelhas anômalas (arqueadas e esparças no terço médio), fendas palpebrais estreitas, cílios longos, aparente hipertelorismo ocular, base e ponta nasal largas, FLP bilateral, lábio inferior grosso e evertido, queixo pequeno, hipotonia, ADNPM e movimentos repetitivos.	RM: leucomaláciaperiventricular
4	M	14a9m	Gestação: sem intercorrências, parto normal, a termo. PN: 2.470 g; EN: 44 cm IMC: 15a;IPC: 23a	Obesidade, microcefalia, fendas palpebrais estreitas, estrabismo convergente, orelhas pequenas com anti-hélice anômalo, FLP bilateral, ADNPM, atraso de fala e dificuldades de aprendizagem.	nc
5	M	7a	Gestação: sem informação descoordenação de sucção e deglutição, disfagia, glossoptose quando bebê, convulsões a partir dos 3 a. Histórico familiar: - pai com sinais clínicos faciais sugestivos de Velocardiofacial. TC de crânio: hematoma subgaleal na convexidade posterior e calcificações parietais nas artérias carótidas internas intracavernosas. RM de crânio: pequena imagem com hipersinal em T2 na hipófise. Análise microdeleção: duplicação no 22q11.	Dolicocefalia, implantação de cabelo baixa na fronte, sobrancelhas arqueadas, fendas palpebrais estreitas, anomalia ocular (miopia, astigmatismo), SR (micrognatia, fissura de palato e glossoptose), dificuldade respiratória, laringomalácia, cardiopatia congênita e ADNPM.	ECG: sem alterações Eletroneurologograma digital com mapeamento cerebral demonstrando alentecimento da atividade elétrica cerebral na região temporal esquerda.

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
6	F	19a	Gestação: sem intercorrências, parto normal, pré-termo. PN: 2.900 g IMC: 19a; IPC: 22a	Orelhas proeminentes com anti-hélice simplificados, FL unilateral, ADNMP, dificuldades de aprendizagem.	nc
7	F	3a11m	Gestação: hipotireoidismo materno controlado, parto normal, a termo. PN: 3.070 g EN: 50 cm IMC: 40a; IPC: 42a	Assimetria de crânio e face, frontal amplo, olhos encovados, FL unilateral e ADNMP.	Ecocardiograma: sem alterações TC de crânio: corpo caloso afilado, malformação de Chiari I, vários pontos mostrando heterotopia neuronal.
8	M	13a	Gestação: polihidrâmnio, pouca movimentação fetal, stress materno, parto normal, a termo. PN: 2.850 g EN: 50 cm IMC: 28a; IPC: 43a	Perímetro cefálico pequeno, cabelo seco e descolorido, região metópica proeminente, cílios esparsos, deficiência auditiva, FL unilateral, linfedema na perna esquerda, ADNMP, dificuldades de aprendizagem e distúrbio de comportamento.	nc
9	M	10a	Gestação: diabetes gestacional a partir do 7º.m, polihidrâmnio, parto cesáreo PN: 3.330 g EN: 48 cm IMC: 29 IPC: 25	Crânio grande, frontal amplo, anomalia ocular (miopia e hipermetropia), deficiência auditiva, FLP unilateral, ADNMP, dificuldades de aprendizagem e distúrbio de comportamento.	nc
10	M	18a11m	Gestação: dores abdominais durante a gestação, pré-termo PN: 1.920 g EN: 43 cm IMC: 34a; IPC: 37a	Baixa estatura, FLP bilateral, incisivo central único, cardiopatia, ADNMP, déficit intelectual, dificuldades de aprendizagem.	nc
11	M	53a	Gestação: sem intercorrências parto fórceps, pré-termo. PN: 2.500 g EN: 48 cm Histórico familiar: - Ao nascimento apresentou defeito de pele (semelhante à queimadura) e lesões nas articulações, nádegas, escalpo e pé. - filha com anomalia ocular, fendas palpebrais amplas, olhos proeminentes e lagoftalmia.	Fácies alongado, ponte nasal alta, lábio superior em V, FP, pescoço largo (pterígio coli, com limitação da movimentação), encurtamento da perna e dificuldades de aprendizagem.	nc
12	F	3a2m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, pré- termo. PN: 2.015 g EN: 43 cm IMC: 20a; IPC: 21a	Assimetria de crânio, SR (FP, micrognatia, glossoptose), crises convulsivas, ADNMP e atraso de fala.	nc

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
13	M	2a7m	Gestação: descolamento de placenta no 3º. mês, contrações no 5º. mês, medicação até o final da gestaçãoparto cesáreo, a termo, cianose. IMC: 23a; IPC: 30a	Crânio alongado, frontal longo, FP, orelhas grandes proeminentes e anti-hélice simplificado e comportamento agitado.	nc
14	M	7a3m	Gestação: sem intercorrências, parto normal, a termo. PN: 3.200 g CN: 45 cm Histórico familiar: - mãeapresenta fâcias atípica, orelhas proeminentes, fendas palpebrais pequenas e rima bucal assimétrica.	Aparente hipertelorismo, FLP unilateral, cardiopatia, distúrbio de comportamento, ADNPM e dificuldades de aprendizagem.	nc
15	F	14a2m	Gestação: sem intercorrências parto normal, a termo. PN: 2.700 g IMC: 14a IPC: 21a Histórico familiar: - Dois meios-irmãos com atresia de coanas (óbitos ao nascimento).	Assimetria de face à direita, sinofre, hipertelorismo ocular, orelhas com implantação baixa e hélices anômalos, hemangioma plano na fronte e pálpebras, FLP, cardiopatia congênita (persistência do canal atrial), anomalia de coluna, ADNPM, deficiência intelectual, comprometimento de fala e linguagem, transtorno do espectro do autismo (movimentos repetitivos).	Ecocardiograma: PCA
16	M	7a1m	Gestação: anemia no 6º. mês de gestação, infecção urinária, uso de cefalexina, episódios de hipotensão arterial (desmaios), parto cesáreo, a termo PN: 3.010 g EN: 46 cm Perinatal: cirurgia de mielomeningocele com 1 d, internado 3m (60 dias em UTI) IMC: 18a IPC:24a	Assimetria de crânio, hidrocefalia, sobrelhas arqueadas, cílios longos; estrabismo convergente, filtro proeminente FP, apêndice pré-auricular, anomalia do tragus à direita, anomalia vertebral, mielomeningocele, hidronefrose, criptorquidia, ADNPM e atraso na aquisição da fala. Aos 3a 2m: P: 12,480 g; A: 80,8 cm (P<3); PC: 45,5 cm (P<50)	Ecocardiograma: normal
17	F	11a	Gestação: dores abdominais durante toda a gestação parto cesáreo, a termo. PN: 2.600 g EN: 48 cm IMC: 20a IPC: 25a Histórico familiar: Consanguinidade parental	Fâcias atípico, SR (FP, micrognatia, glossoptose), ADNPM, atraso na aquisição da fala, dificuldade de aprendizagem e distúrbio de comportamento. Frequenta escola especial (APAE). É capaz de fazer cópias de texto simples, boa compreensão das coisas diárias, mostra pouco interesse por assistir TV e vaidade pessoal.	nc

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
18	F	18a	Gestação: sangramento e hipertensão com uso de medicação, relato de dormência e inchaço nos membros superiores. parto cesáreo, pós-termo, Perinatal: cianótica, crises convulsivas após nascimento. PN: 3.500 g EN: 42 cm IMC: 25a IPC: 26a	Fácies arredondado, hipertelorismo ocular, epicanto à esquerda, FLP unilateral, ADNPM, distúrbio de comportamento e dificuldades de aprendizagem.	nc
19	F	16a3m	Gestação: eclampsia no 7º. parto cesáreo, pré-termo Perinatal: infecção hospitalar (internada um mês em UTI), dificuldade respiratória (entubada ao nascimento) PN: 1.500 g IMC: 32a IPC: 34 a	Frontal estreito, filtro curto, lábio superior grosso, FP, ADNPM, déficit intelectual, dificuldades de aprendizagem.	nc
20	M	2a7m	Gestação: hipertensão durante a gestação, uso de medicação; aumento da glicemia no final da gestação parto cesáreo, a termo. PN: 3.400 g EN: 49 cm IMC: 38a IPC: 45a Histórico Familiar: - Ms-PCR e mTP-PCR da mãe mostraram padrão de picos compatível com um alelo pré-mutado em FMR1 (cerca de 80 repetições CGG).	Crânio grande, sobrancelhas grossas, fendas palpebrais amplas, olhos grandes, FLP unilateral, orelha grandes e discretamente proeminentes, base e ponte nasal largas, dedos alongados, displasia de quadril, sobreposição de artelhos, ADNPM, atraso na aquisição da fala e da linguagem e distúrbio de comportamento (movimentos repetitivos).	Ms-PCR e mTP-PCR: mutação completa (acima de 200 repetições CGG), indicando metilação do gene FMR1.
21	M	2a7m	Gestação: sem intercorrências parto normal, a termo. PN: 1.910 g EN: 43 cm IMC: 15a IPC: 16a Várias internações (gastrotomia aos 8 m).	Microcefalia, implantação de cabelo baixa na fronte, frontal plano, estreitamento bitemporal, sobrancelhas finas, olhos proeminentes, fendas palpebrais estreitas, ptose palpebral, nevus na face, boca grande, queixo triangular, orelhas pequenas, rebaixadas, rodadas, com hélices dobrados, lobos largos com entalhe vertical, lábio superior fino, boca grande, FP, cardiopatia, ADNPM, convulsões Aos 22m, déficit pômbero-estatural: P: 8.115 g A: 72 cm PC: 42 cm	Ecocardiograma: comunicação interatrial de pequeno tamanho (tipo ostium secundum), comunicação interventricular perimembranosa de via de entrada de pequeno tamanho, estenose valvar mitral discreta, coarctação da aorta.

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
22	F	17a9m	nc	Microcefalia, fendas palpebrais inclinadas para cima, fâcies miúdo, sobrancelhas arqueadas, fendas palpebrais inclinadas para cima, hipoplasia mandibular, FP, micrognatia, orelhas pequenas com hélice simplificado, pescoço alongado, cardiopatia congênita, dígitos longos e afilados, dificuldade de aprendizagem, distúrbio de comportamento, ADNPM.	nc
23	F	1a5m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo PN: 4.490 g EN: 56 cm IMC: 25a IPC: 23a crises convulsivas com 1 m de idade, internação (11 dias) para válvula de derivação, gastrotomia e correção de refluxo aos 2m de idade.	Conformação anômala do crânio, frontal alongado e estreito, implantação anômala de cabelos na fronte, cílios longos, ptose palpebral à esquerda, holoprosencefaliaalobar, FLP unilateral, crises convulsivas e ADNPM.	US do crânio: não se identifica a presença de corpo caloso e cavum do septo pelúcido, ventrículo e tálamo não definidos, não se identificam estruturas da fossa posterior (holoprosencefaliaalobar).
24	M	7a9m	Gestação: 4 ^o m infecção urinária. parto cesáreo, a termo, PN: 2.170 g Perinatal: internado 4d para alimentação, aos 3m parada cardíaca (diagnóstico de cardiopatia), aos 2a cirurgia cardíaca, uso de sonda até 3a6m. IMC: 32 IPC: 29	Crânio grande, frontal amplo e proeminente, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais discretamente estreitas, pupila dilatada à direita, FLP bilateral, orelhas posteriormente rodadas, lobo hipoplásico, cardiopatia, ADNPM, atraso na aquisição da fala e distúrbio de comportamento.	nc
25	M	16a6m	Gestação: sem intercorrências, parto cesáreo, a termo PN: 2.350 g EN: 43 cm Perinatal: dificuldade respiratória (internados 17 dias na UTI) IMC: 24a IPC: 23a	Frontal amplo, sobrancelhas grossas, fendas palpebrais estreitas, narinas hipoplásicas, FP, deficiência auditiva, ADNPM e dificuldade de aprendizagem.	nc
26	M	12a	Gestação: pré-eclâmpsia parto cesáreo, pré-termo. PN: 1.090 g EN: 46 cm	Sobrancelhas grossas, sinofre, fendas palpebrais longas, orelhas proeminentes com hélice e anti-hélice simplificados, FLP unilateral, ADNPM e dificuldade de aprendizagem.	nc
27	M	4a11m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo. IMC: 33a IPC: 30a	Frontal amplo, FP, queixo pequeno, ADNPM e transtorno do espectro do autismo.	nc

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
28	F	16a	Gestação: sangramento, placenta prévia, hipertensão a partir do 5m, uso de medicação até o final da gestação parto cesáreo, a termo. Perinatal: internada por 2 dias no oxigênio. IMC: 25a IPC: 22a	Microcefalia, fendas palpebrais amplas, FLP bilateral, anomalias dentárias (hipoplasia dentária, microdente, agenesia dentária), mandíbula assimétrica, ADNPM.	nc
29	F	19a3m	Gestação: perda de líquido amniótico aos 8m, oligodramnio parto cesáreo, pré-termo. PN: 2.760 g EN: 53 cm IMC: 21a História Familiar: - Mãe com histórico de abortos recorrentes (2).	Fácies grosseiro, sobrancelhas grossas, sinofre, anomalia de orelha interna bilateral, orelhas com baixa implantação, posteriorizadas e anti-hélices simplificados, alteração de cóclea, pescoço largo e curto, cardiopatia, ADNPM e distúrbio de comportamento.	US da mama: mamas pouco desenvolvidas para a idade US abdominal: ovários não visualizados, útero infantil US renal: normal RM encéfalo: septação incompleta de ambas as cócleas e agenesia CSC, encéfalo normal. Avaliação oftalmológica normal Ecocardiograma: insuficiência valvar mitral leve a moderada, PCA com shunt discreto, CIV subvalvar aórtica.
30	F	22a8m	Gestação: sem intercorrências a termo, Perinatal: internada (5d) com hipoglicemia, quadro de desnutrição. PN: 2.660 g EN: 46 cm IMC: 22a IPC: 23a	Baixa estatura, cabelos secos, frontal amplo, implantação alta de cabelos na região frontal, sobrancelhas esparsas e escassas, hipoplasia da face média, blefarofimose, anomalias oculares (miopia (5 di e 7,5 di) e astigmatismo (0.5 di/0.5 di)), filtro curto, boca pequena, fissura de palato submucosa, manchas café-com-leite (região periorbital e queixo) queixo pequeno, orelhas com lobos aderidos, ombros assimétricos, hipoidrose, dígitos afilados, braquidactilia, sindactilia 3, 4 parcial de dígitos, pés pequenos, dificuldade de aprendizagem e atraso de fala de linguagem.	RM encéfalo: anomalia de Dandy-Walker Erros inatos do metabolismo e função tireoidiana: normal
*31	M	16a7m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo. PN: 2.720 g EN: 49 cm Histórico familiar: - recorrência do fenótipo em irmão com padrão fácil atípico, FP, ADNPM, atraso na aquisição da fala, dificuldades de aprendizagem e distúrbios de comportamento (indivíduo 2). - mãe com baixa estatura, estrabismo divergente, micrognatia, mãos pequenas. - pai com baixa estatura, mãos pequenas, dígitos curtos.	Braquicefalia, frontal estreito, implantação baixa de cabelos na fronte e no occipital, sobrancelhas grossas e proeminentes, olhos encovados, fendas palpebrais estreitas, ponta nasal alta, narinas hipoplásicas, columela pequena, filtro proeminente, micrognatia, nevus na face à esquerda, FP, glossoptose, lobos largos, ADNPM, distúrbio de linguagem e déficit intelectual. Aos 15a: P: 87.700 g A: 161 cm PC: 57,5 cm	Nasofaringoscopia: obstrução respiratória tipo I Avaliação oftalmológica: estrabismo divergente inconstante

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
32	M	18a	Gestação: sem intercorrências parto normal, pré-termo. PN: 2.300 g IMC: 15a IPC: 18a	microcefalia, frontal estreito, sobrancelhas bem arqueadas, ptose palpebral bilateral, filtro curto, lábios grossos, mantém a boca entreaberta, incisivos centrais largos, FP, ADNPM e dificuldade de aprendizagem.	nc
33	M	6a1m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo. PN: 3.070 g EN: 48,5 cm IMC: 32a Histórico Familiar: - Mãe com FLP, fístula o lábio inferior, dificuldade de aprendizagem, ADNPM, atraso de fala e comportamento atípico.	Baixa estatura, fâcies grosseiro (sobrancelhas grossas, sinofre, epicanto bilateral, base nasal baixa, lábio inferior grosso), FLP, déficit de crescimento, ADNPM e comprometimento intelectual.	nc
34	F	7a	Gestação: sangramento na 9ª e semana e 5º mês; uso de progesterona; parto cesáreo; a termo. PN: 2.160 g EN: 43,5 cm IMC: 29a IPC: 37a Histórico Familiar:	Crânio pequeno, frontal estreito, sobrancelhas arqueadas, sinofre, fendas palpebrais inclinadas para cima, anomalia ocular (hipermetropia), nariz pequeno, narinas antevertidas, SR, FP, apêndice pré-auricular; dificuldade de aprendizagem; distúrbio de comportamento. P: 22.400 g E: 123 cm	nc
35	M	21a1m	Gestação: sem intercorrências parto normal, a termo. IMC: 19a IPC: 33a	Orelhas proeminentes, anti-hélices simplificados, rima bucal inclinada para baixo, lábio superior fino, FP, lábio inferior grosso, ADNPM, déficit cognitivo, atraso de fala e de linguagem.	nc
36	F	2a	Gestação: diminuição de líquido amniótico (5ºm), feto com déficit pômdero-estatural. pré-termo. PN: 2.000 g IMC: 24a IPC: 27a	Déficit pômdero-estaturalpré e pós-natal, fendas palpebrais estreitas, orelhas proeminentes, base nasal baixa, FP, cardiopatia congênita e distúrbio de comportamento.	nc
37	M	3a8m	Gestação: sem intercorrências IMC: 18a IPC: 23a	Microcefalia, sobrancelhas grossas, olhos grandes, cílios longos, ponta nasal larga, lábio superior fino, rima bucal inclinada para baixo, FP submucosa, micrognatia, orelhas grandes e proeminentes, manchas de coloração na pele (braços e pernas), hipotonia, ADNPM, atraso na aquisição da fala, déficit intelectual e transtorno do espectro do autismo (pouco contato visual, movimentos repetitivos, atenção às coisas que giram, flaps, balanceio de corpo, pouco interesse por brinquedos).	RM: cisto cerebral

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
38	M	12a5m	<p>Gestação: ultrasonografia aos 6m mostrou déficit de crescimento, parto cesáreo, pré-termo</p> <p>Perinatal: icterícia neonatal permanecendo na incubadora por 3m</p> <p>PN: 650 g EN: 32 cm</p> <p>IMC: 29a IPC: 35a Crises convulsivas aos 9 a, uso de medicamento.</p>	Crânio com formato atípico (triangular), frontal amplo, com fâcies triangular, sobrancelhas anômalas, esclera azulada, lábio superior fino, FP, orelhas proeminentes com hélices e anti-hélices simplificados, pescoço alongado, rima bucal inclinada para baixo. FP, cardiopatia congênita, hipospadia, sem controle esfinterianos, clinodactilia do 5º. dígito bilateral, pregas palmares simplificadas, ADNMP, convulsões, atraso de fala e de linguagem, distúrbio de comportamento (movimentos repetitivos das mãos).	<p>Ecodopplercardiograma: persistência do canal atrial</p> <p>US transfontanela: hemorragia perintraventricular à direita</p> <p>Fundoscopia: padrão albinóide. Periferia temporal externa avascular. Sem presença de linha ou crista.</p> <p>US abdominal total: coleção cística retroumbilical, aparentemente localizada na região abdominal.</p> <p>RM crânio: sinais de pequena coleção subdural na região fronto-parietal direita (hematoma crônico), alterações hipóxico-isquêmicas em região frontal parietal homolateral com sangramento antigo no sulco central.</p> <p>eletroencefalograma: atividade de base discretamente desorganizada; surtos lentos; delta amplo em região temporal bilateral, síncronos e assíncronos principalmente à esquerda.</p> <p>US renal: rins em ferradura.</p>
39	F	11a11m	<p>Gestação: quadro de depressão materna parto normal, a termo.</p> <p>PN: 2.415 g EN: 45 cm IMC: 20a IPC: 22a</p> <p>Histórico Familiar: - mãe tem fendas palpebrais oblíquas para cima, orelhas pequenas e proeminentes e déficit intelectual.</p>	Estreitamento bitemporal, cabelos esparsos, sobrancelhas esparsas, poucos cílios, fendas palpebrais oblíquas para cima, FL unilateral, orelhas proeminentes com anti-hélice simplificado, lobo anômalo bilateral, filtro curto, pescoço longo, dígitos alongados, hipoplasia tenar, ADNPM e atraso na aquisição da fala.	nc
40	M	8a5m	<p>Gestação: uso de anticonvulsivante (fenobarbital) durante toda a gestação</p> <p>parto normal, a termo</p> <p>Perinatal: cianose, internado (2m) devido a vários episódios de crises convulsivas.</p> <p>PN: 2.980 g IMC: 25a IPC: 29a</p> <p>Histórico Familiar: - mãe com epilepsia desde os 7a de idade.</p>	Estreitamento bitemporal discreto, fâcies arredondado, FP, filtro demarcado, rima bucal inclinada para baixo, cardiopatia congênita, ADNPM e atraso na aquisição da fala.	Ecocardiograma: CIA tipo "ostium secundum" (pequeno tamanho) sem repercussão hemodinâmica.

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
41	M	11a1m	Gestação: sem intercorrências parto normal, a termo. PN: 3.000 g EN: 48 cm IMC: 31a	Estreitamento bitemporal, fâcies grosseiro (sobrancelhas varridas no terço lateral, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais discretamente estreitas), base nasal baixa, ponte e ponta nasais largas, hipotonia bucal, FL bilateral, orelhas pequenas e anômalas com hélices largos e dobrados, cardiopatia congênita, criptorquidia e dificuldade de aprendizagem.	MLPA P064 da mãe: sem alterações
42	F	14a	Gestação: sem informação parto normal com fórceps, pré-termo. Perinatal: cianose, 3m na incubadora. PN: 700 g EN: 25 cm IMC: 25a IPC: 26a Histórico familiar: - mãe com histórico de aborto (1); - irmão com malformação de Dandy-Walker, crises convulsivas, arritmia cardíaca e ADNPM; - irmão com dificuldade de aprendizagem.	Fendas palpebrais estreitas, FLP unilateral, crises convulsivas esporádicas, ADNPM e dificuldades de aprendizagem.	nc
43	F	18a	Gestação: sem intercorrências IMC: 18a IPC: 20a	Frontal estreito, implantação baixa de cabelo na fronte, sobrancelhas grossas e arqueadas, sinofre, fendas palpebrais estreitas, ptose palpebral, estrabismo, SR (FP, micrognatia e glossoptose), apêndice pré-auricular unilateral, cardiopatia, ADNPM e dificuldades de aprendizagem.	nc
44	M	15a1m	Gestação: sem intercorrências IMC: 15a IPC: 26 a	Aparente hipertelorismo ocular, sobrancelhas grossas, FLP bilateral, tamanho diferente das pernas, ADNPM e dificuldades de aprendizagem.	nc
45	F	8a2m	Gestação: infecção urinária parto normal, pré-termo. PN: 1.960 g IMC: 33a IPC: 28a Histórico Familiar: - pai com conformação de crânio diferente.	Déficit pômbero-estatural, baixo ganho de peso, fenda palpebral estreita, boca pequena, (FP, micrognatia e glossoptose), ADNPM, dificuldade de aprendizagem e déficit de atenção.	nc
46	M	13a	Gestação: sem intercorrências parto normal, a termo. PN: 3.100 g EN: 48 cm IMC: 17a IPC: 25a	Baixa estatura, frontal estreito, sobrancelhas grossas, fendas palpebrais amplas e discretamente estreitas, nariz alongado, base e ponte nasais altas e largas, hipoplasia do arco zigomático e da face média, boca pequena, retrognatia, FLP unilateral, orelhas pequenas e proeminentes, anti-hélices	MLPA P064 da mãe: sem alterações

				simplificados, dificuldade de aprendizagem e traço de anemia falciforme.	
--	--	--	--	--	--

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
47	F	17a 8m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo. PN: 2.830 g IMC: 24a IPC: 47a	Déficit pômbero-estatural, fâcies arredondado, sobrelhas grossas, sinofre, estrabismo, cãlios longos, aparente hipertelorismo ocular, epicanto bilateral, base nasal baixa, ponta nasal larga, orelhas posteriormente rodadas, FLP unilateral, dígitos longos, ADNPM, distúrbio de comportamento (agressividade), dificuldades de aprendizagem. Aos 17a 8m: P: 83.000 g A: 157 cm PC: 54 cm	nc
48	M	2a6m	Gestação: sem intercorrências parto cesáreo, a termo. PN: 2.800 g EN: 45,5 cm IMC: 37a IPC: 43a forame oral pãrvio quando bebê.	Déficit pômbero-estatural, forame oral pãrvio, discreto estreitamento bitemporal, cãlios longos, aparente hipertelorismo ocular, epicanto bilateral, FLP bilateral, ADNPM, atraso de fala e de linguagem.	Arr(hg19)Xq27.2(140,353,243-140,779,447)x2 TC de crânio: normal US transfontanela: sem alterações
49	M	20a	Gestação: sem informação parto normal, pré-termo PN: 3.570 g EN: 44 cm Histórico Familiar: Mãe fez uso de drogas e álcool.	Microcefalia, estreitamento da região temporal, aparente hipertelorismo ocular, estrabismo, FLP unilateral, pit pré-auricular, orelhas proeminentes, ponte nasal alta, cardiopatia e ADNPM.	nc
50	F	6a1m	Gestação: cerclagem no 3º m parto normal, a termo. Perinatal: internada (8d), sonda nasogástrica, desconforto respiratório. PN: 3.435 g EN: 50,5 cm IMC: 28a IPC: 27a gastrotomia (3m). Histórico Familiar: -mãe com abortos recorrentes (5) devido à insuficiência istmo cervical; - tia materna com fissura de lábio e cardiopatia; - primo paterno com fissura de lábio e palato.	Frontal estreito, cabelo com implantação anômala (varrido), hisurtismo frontal, déficit pômbero-estatural, sinofre, estrabismo divergente, base e ponte nasais largas, FLP, retrognatia, orelhas anômalas, pequenas e posteriorizadas, hipoplasia dos lobos, cardiopatia congênita, dígitos longos, disfagia, atraso de fala, não compreende, deficiência intelectual, distúrbios de comportamento (crises de estresse e auto-agressão), transtorno do espectro do autismo (pouco contato visual, balanceio de corpo, interesse por objetos que giram, flap, movimentos repetitivos) e ADNPM.	nc

continua

continuação

Indivíduo	Sexo	Idade	Dados gestacionais e perinatais/antecedentes pessoais e familiares	Sinais clínicos	Exames complementares
51	M	12a4m	Gestação: sem intercorrências parto normal. PN: 3.650 g IMC: 27a	Crânio alongado com frontal proeminente, sobrancelhas grossas, cílios longos, aparente hipertelorismo ocular, olhos encovados, fenda palpebral ampla, fâcies atípico, hemangioma frontal e na base nasal, base nasal larga, FLP unilateral, orelhas rebaixadas e proeminentes, crises convulsivas, ADNPM, comportamento agitado, dificuldade de atenção e de aprendizagem.	nc
52	M	11a3m	Gestação: hipertensão, pré-eclampsia no 2º m e 6º m parto cesáreo, a termo. PN: 2.790 g IMC: 28a IPC: 37a	Crânio alongado, frontal estreito, implantação baixa de cabelos na fronte, SR, FP, dificuldades de aprendizagem, distúrbio de comportamento (agitação e agressividade), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), atraso na aquisição da fala e de linguagem.	Avaliação fonoaudiológica do desempenho escolar e compreensão verbal: transtorno de aprendizagem.

*irmãos; **a**= ano (s); **ADNM**= atraso no desenvolvimento motor; **ADNPM**= atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; **EN**=estatura ao nascimento; **F**=feminino; **FLP**= fissura de lábio de palato; **FP**=fissura de palato; **g** = grama(s);**IMC**= idade materna na concepção;**IPC**= idade paterna na concepção;**M**= masculino; **m**= mês (es);**MLPA**= Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação;**nc**= nada consta;**PCA**=Persistência do Canal Atrial;**PN**=peso ao nascimento;**SR** = Sequência de Robin; **US**=ultrassonografia.

Quadro 1 - Dados gestacionais e perinatais, antecedentes pessoais e familiares e sinais clínicos da casuística

continua

continuação

Obs.: Indivíduo 15 imagem não disponível.

Figura 3 - Aspecto facial dos indivíduos da casuística

4.2 ANÁLISE MLPA

Na análise de MLPA foi possível detectar microdeleções/microduplicações em 6 dos 52 indivíduos estudados (11,5%) (Quadro 2), sendo:

- um indivíduo com deleção del16p13.3;
- dois indivíduos com del22q11.2;
- um indivíduo com dup11p15.5 e dup16q24.3;
- um indivíduo com dup13q34;
- um indivíduo com rearranjo complexo dupXp22.33/Yp11.2 e del18q23.

As microdeleções/microduplicações encontradas nas regiões subteloméricas(P036) e regiões de síndrome conhecidas (P064) foram confirmadas repetindo as reações em novo experimento. O teste P250 também foi utilizado para confirmação da deleção 22q11 e para pesquisa de herança das deleções 22q11.1 nas mães dos indivíduos 41 e 46. Em ambas não foram encontradas alterações na região 22q11.2 e nas demais regiões analisadas. As amostras dos pais não estavam disponíveis para análise.

Detalhes das alterações encontradas incluindo a região das CNVs, tipo de CNV e as sondas MLPA foram dispostos na Quadro 2.A descrição clínica e as análises das MLPAs dos seis indivíduos com variação no número de cópias foram descritas separadamente no item 5.3.

Indivíduo	Idade	Sexo	Região da CNV/ Sonda	Tipo de CNV
24	5a8m	M	11p15.5 (RIC8A) 16q24.3 (GAS8)	Duplicação Duplicação
30	22a8m	F	16p13.3 (POLR3K)	Deleção
33	6a 6m	M	Xp22.33/Yp11.2 (SHOX) 18q23 (RBFA)	Duplicação Deleção
36	2a	F	13q34 (F7)	Duplicação
41	11a1m	M	22q11.2 (DGCR8, CLTCL1, ZNF74, GNB1L, SNAP29, MED15, CDC45, HIRA, TBX1_1, CLDN5, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, LZTR1, CDC45L)	Deleção
46	13a	M	22q11.2 (DGCR8, CLTCL1, ZNF74, GNB1L, SNAP29, MED15, CDC45, HIRA, TBX1_1, CLDN5, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, LZTR1, CDC45L)	Deleção

a= ano(s); m= mês (es); F= feminino; M= masculino; chr= cromossomo; CNV= variante de número de cópias de DNA.

Quadro 2 - Alterações encontradas em seis indivíduos da casuística, incluindo a região das CNVs, tipo de CNV e as sondas MLPA

Em 46 dos 52 indivíduos estudados (88,4%) não foram detectadas variantes de número de cópias nas regiões subtelomérica e/ou em regiões específicas para síndromes de microdeleção, pelo método utilizado.

Posteriormente, os indivíduos 20 e 48 tiveram oportunidade de realizar testes moleculares para diagnóstico de alterações cromossômicas submicroscópicas não previstos nesse estudo. Esses indivíduos, que apresentaram alterações detectadas por esses testes adicionais, possibilitando o diagnóstico sindrômico, foram descritos separadamente no item 4.3.

4.2.1 Descrição clínica e análise MLPA dos seis indivíduos com variações de número de cópias

Indivíduo 24: sexo masculino, 7 anos e 9 meses, filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: gestação com infecção urinária no quarto mês, parto cesáreo, a termo, com peso de 2.170 g ($P < 3$), comprimento de 43 cm ($P < 3$).

História familiar: Idade materna e paterna na concepção 32 e 29 anos, respectivamente.

Dados clínicos aos 7 anos e 9 meses: crânio grande, frontal amplo e proeminente, aparente hipertelorismo ocular, fendas palpebrais discretamente estreitas, coloboma de íris à direita, pré-maxila bem projetada, fissura de lábio e palato (Figura 4), cardiopatia, testículo retrátil, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbio de comportamento, atraso na aquisição da fala e de linguagem e transtorno do espectro do autismo. Histórico de parada cardiorespiratória aos 3 meses de idade. Cariótipo de bandamento G normal. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) mostrou variante de número de cópias (duplicação) nos cromossomos 11p15.5 e 16q24.3 (Quadro 3, Figuras 5, 6 e 7). Nenhuma CNV para síndromes de microdeleção específicas foi identificada por meio da análise do MLPA P064.

a= frente; b= perfil esquerdo; c= perfil direito.

Figura 4 - Aspectos faciais do indivíduo 24

MLPA	CNV	Região/sonda
P036	Duplicação	11p15.5(RIC8A) 16q24.3 (GAS8)

CNV= variante de número de cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA); **MLPA**= sondas de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Quadro 3 – CNV subtelomérica detectada no indivíduo 24, região cromossômica e sonda MLPA

Figura 5 - Indivíduo 24. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e as duplicações (quadrados vermelhos) das sondas RIC8A na região 11p15.5 e GAS8 na região 16q24.3

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 6 - Localização genômica da sonda MLPA RIC8A na região 11p15.5 (GRCh38, hg38)

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 7 - Localização genômica da sonda MLPA GAS8 na região 16q24.3 (GRCh38, hg38)

Análise do MLPA P036 do indivíduo 24 mostrou duplicação de duas regiões subteloméricas: a sonda RIC8A (11p15.5) e a sonda GAS8 (16q24.3), que justificariam as anomalias apresentadas pelo indivíduo.

De acordo com informações dos bancos de dados DGV (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016), DECIPHER (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) ambas as sondas estão localizadas em regiões comprovadamente polimórficas, ou seja, variantes padrão ouro (regiões variantes curadas que compartilham pelo menos 70% de seu comprimento de maneira recíproca, encontradas em pelo menos dois estudos diferente e duas amostras diferentes). Duplicações entre 1Mb e 5Mb na região 11p15.5, envolvendo cinco a seis genes, dentre eles o gene *RIC8A*, foram descritas em indivíduos normais, apontando para variantes benignas no CLINVAR (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016). No entanto, a duplicação de cinco a seis genes nessa mesma região foi relatada em dois indivíduos com déficit de crescimento, atraso no desenvolvimento e atraso de fala e de linguagem, sendo considerada de significância incerta (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016). Devemos considerar ainda que duplicações variáveis, maiores que 5Mb na região 11p15.5 (91 a 481 genes) foram descritas em indivíduos com comprometimento no desenvolvimento neuropsicomotor (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016). Em

um desses indivíduos foram observadas múltiplas anomalias congênitas, incluindo déficit de crescimento, fácies atípico, cardiopatia congênita, hipotonia e atraso na aquisição da fala e de linguagem. A região 11p15.5 contém 102 genes conhecidos e 11 deles, (*CD151*, *CTSD*, *DEAF1*, *HRAS*, *IFITM5*, *IGF2*, *KCNQ1*, *LRRC56*, *PNPLA2* e *SLC25A22*) estão na Base de Dados de Genótipo-Fenótipo dos Distúrbios do Desenvolvimento (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) porque as variantes desses genes foram anteriormente associadas a fenótipos específicos do desenvolvimento.

Distúrbios de imprinting na região 11p15.5 estão implicados na etiologia da síndrome de Beckwith-Wiedemann (OMIM# 130650), e em casos da síndrome de Silver-Russell (OMIM# 180860) (JURKIEWICZ et al., 2017; CAMMARATA-SCALISI et al., 2018; DAGAR et al., 2018; JANCHEVSKA et al., 2018; SHTERENSHIS et al., 2018; MACKAY et al., 2019; YAMADA et al., 2019), tumor de Wilms (OMIM# 194071) (ALGAR et al., 2007; WHITE; LIU; NAHAR, 2018), síndrome IMAGE (atraso do crescimento intrauterino, displasia metafisiais, hipoplasia adrenal congênita e anomalias genitais) (OMIM#614732) (MILANI et al., 2014; JURKIEWICZ et al., 2017) e hemi-hiperplasia idiopática (OMIM#235000) (JURKIEWICZ et al., 2017; SHTERENSHIS et al., 2018a; YAMADA et al., 2019), entretanto, os aspectos clínicos do indivíduo 24 não podem ser relacionados com nenhuma delas.

Em relação à duplicação na região a 16q24.3 também presente no indivíduo 24, busca nos bancos de dados DGV (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016) e ClinVar (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a) mostrou que duplicações do gene *GAS8* (sonda das regiões 16q24.3) foram descritas na população normal, sendo consideradas benignas. No entanto, há controvérsias, pois, duplicação do gene *GAS8* isolada ou associada a outros genes (17 genes) foi classificada por alguns centros como variante de significado incerto.

As duplicações maiores que 5Mb (140 a 500 genes) na região 16q24.3 são claramente reconhecidas como patogênicas, enquanto duplicações menores, entre 1Mb a 5Mb (67 a 108 genes), descritas em indivíduos com cardiopatia congênita, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, fissura orofacial, atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem, foram consideradas patogênicas ou de patogenicidade incerta (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a). A região 16q24.3 tem 51 genes conhecidos, dos quais 8

(*ANKRD11*, *CDT1*, *CHMP1A*, *FANCA*, *GALNS*, *GAS8*, *PIEZO* e *TUBB3*) estão na Base de Dados de Genótipo-Fenótipo dos Distúrbios do Desenvolvimento (DDG2P, DECIPHER) porque suas variantes são associadas a fenótipos específicos do desenvolvimento (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018).

Embora não seja possível delimitar as regiões duplicadas no indivíduo 24, por limitação da técnica de MLPA, a presença de fácies atípico, cardiopatia, atraso no desenvolvimento e atraso de fala sugere haver relação causal com as regiões duplicadas 11p15.5 e/ou 16q24.3. Interessante notar que fissura orofacial foi relatada em indivíduos com duplicações menores do que 5Mb na região 16q24.3 (CLINVAR, 2019). A presença de fissura no indivíduo 24, associada ao quadro de importante comprometimento no desenvolvimento neuropsicomotor, reforça essa possibilidade. Para melhor definição do efeito dessas duplicações no fenótipo do indivíduo 24 faz-se necessário a investigação do material genético dos pais para verificar a herança das regiões, bem como, a utilização de técnicas de análise cromossômica com maior nível de resolução (tais como o microarray) para determinação dos pontos de quebra destas alterações.

Indivíduo 30: sexo feminino, 22 anos, filha de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: Gestação sem intercorrências, parto normal. Peso ao nascimento 2.660g, comprimento de 46 cm.

História Familiar: Idade materna e paterna na concepção, 22 e 23 anos, respectivamente. Levantamento da história familiar mostrou ausência de casos similares na família.

Antecedentes pessoais: os 4 anos e 10 meses apresentava déficit pôndero-estatural, com peso de 14 kg (P>3), altura de 103 cm (P>3) e perímetro cefálico de 47 cm (P<3), frontal amplo com estreitamento bilateral, olhos pequenos, ponta nasal achatada, boca pequena, fissura de palato submucosa, orelhas com hélice anômalo, lobo hipoplásico, mãos pequenas, dígitos finos e longos, pés tortos, atraso na aquisição da fala e da linguagem. Reavaliação aos 8 anos de idade observou-se, além dos sinais descritos anteriormente, limitação da abertura bucal, cabelos e pele secos e hiperqueratose plantar. Cariótipo de bandamento G foi normal. Aos 11 anos de idade apresentou peso de 27,7 kg, altura de 142 cm, miopia alta (-5,5 e 3,5 dioptrias), pés pequenos braquidactilia de artelhos, implantação baixa do quinto

dígito bilateralmente e dificuldades de aprendizagem. Ressonância magnética cranioencefálica mostrou anomalia de Dandy-Walker. Reavaliações aos 16 anos e 19 anos de idade mostraram baixa estatura, miopia alta (-8.0 dioptrias), manchas hipercrômicas (café-com leite) nos braços e na região perioral e dificuldades de aprendizagem.

Dados clínicos da última avaliação aos 22 anos e 8 meses: peso de 38 kg, altura de 147,5 cm ($P < 3$), baixa estatura, frontal amplo, implantação alta de cabelos na região frontal, sobrancelhas esparsas e escassas, base nasal baixa, blefarofimose, miopia (-5,00 e - 7,5 dioptrias), filtro curto, boca pequena, manchas café-com-leite no queixo, orelhas com lobos aderidos, ombros assimétricos (Figura 8), braquidactilia, dígitos afilados, sindactilia 3, 4 parcial de dígitos, pés pequenos, cardiopatia, cabelos secos, hipoidrose e dificuldade de aprendizagem. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) mostrou variante de perda de número de cópias no cromossomo 16p13.3 (Quadro 4, Figuras 9 e 10) e MLPA para síndromes de microdeleção específicas (P064) foi normal.

a= frente; b= perfil esquerdo; c= perfil direito.

Figura 8 - Aspectos faciais do indivíduo 30

MLPA	CNVs	região/sonda
P036	Deleção	16p13.3 (POLR3K)

CNV= variante de número de cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA); **MLPA**= sondas de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Quadro 4- CNV subtelomérica detectada no indivíduo 30, região cromossômica e sonda MLPA

Figura 9 - Indivíduo 30. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e a deleção da sonda POLR3K (quadrado vermelho) na região 16p13.3

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 10 - Localização genômica da sonda MLPA POLR3K na região 16p13.3 (GRCh38, hg38)

O indivíduo 30 apresentou sinais clínicos, incluindo fácies atípico, fissura de palato submucosa, atraso de fala e de linguagem e dificuldade de aprendizagem, sugestivos do diagnóstico clínico de síndrome Velocardiofacial. No entanto, a análise do MLPA P064 para sondas da região 22q11 não mostrou alteração do número de cópias. Esse resultado negativo foi confirmado pela análise do MLPA P250, específico para região 22q11.

Por meio da análise das regiões subteloméricas (MLPA036) foi possível identificar deleção em heterozigose da sonda POLR3K na região cromossômica 16p13.3. Análise em bancos de dados genéticos (DGV, CLINVAR e DECIPHER) (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a; SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) mostrou que deleções na região da sonda POLR3K (16p13.3) foram descritas em indivíduos normais. No entanto, deleção entre 500 kb e 1 Mb, envolvendo 4 genes (*POLR3K*, *MPG*, *RHBDF1* e *SNRNP25*) foi descrita em um

indivíduo com atraso no desenvolvimento e atraso de fala e de linguagem, sendo considerada variação de significado incerto. Deleções maiores (1 Mb a 5 Mb; 59 a 115 genes) na região 16p13.3 foram descritas em indivíduos com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e consideradas como variações patogênicas (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a).

De acordo com o estudo de caso-controle de CNV em 15.749 casos com atraso no desenvolvimento inexplicável e/ou deficiência intelectual e/ou características dismórficas e/ou anomalias congênicas múltiplas e/ou transtornos do espectro do autismo, realizado por pesquisadores do Consórcio de Padrões Internacionais para Matrizes Citogenômicas (ISCA), deleções na região 16p13 (1,5 Mb e 3 Mb) foram detectadas em 22 indivíduos (1/716 indivíduos), sendo considerada uma causa frequente de distúrbio do desenvolvimento intelectual (KAMINSKY et al., 2011). A região 16p é considerada região de genes contíguos e a deleção dessa região resulta na síndrome alfa talassemia e deficiência intelectual relacionada ao cromossomo 16 (ATR-16; OMIM#141750) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2016b). A síndrome é causada pela haploinsuficiência de gene da α -globina (HAB1 e HAB2) e de outros genes envolvidos na deficiência intelectual (HARTEVELD et al., 2007). Clinicamente, a condição é caracterizada por dismorfias craniofaciais, incluindo frontal proeminente, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, hipertelorismo leve, ponta nasal ampla e orelhas pequenas posteriormente rodadas. Pescoço curto, com dobra horizontal e implantação baixa e em forma de tridente de cabelos na região posterior, anomalias palatinas, anomalias hematológicas (alfa-talassemia ou anemia hipocrômica microcítica sem deficiência de ferro), pé torto, manchas hiperocrômicas (café-com-leite), atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual leve, atraso na aquisição da fala e de linguagem (LINDOR et al., 1997; GALLEG0 et al., 2005; HARTEVELD et al., 2007; GIBSON et al., 2008). De acordo com Hartevel et al. (2007), a região do cromossomo 16 cuja haploinsuficiência resulta nos aspectos clínicos da síndrome ATR-16 é restrita para 800 kb localizadas entre 0,9 e 1,7 Mb do telômero. A sonda POLR3K, deletada no indivíduo 30, é adjacente a essa região, estando localizada a aproximadamente 0,4 Mb do telômero. Embora não seja possível delimitar o tamanho de deleção encontrada no indivíduo 30, a similaridade dos sinais clínicos, principalmente frontal amplo, ponte nasal larga, fissura de palato submucosa, pés

tortos, manchas hipercrômicas e atraso na aquisição da fala e de linguagem, sugere que deleção na região 16p esteja influenciando o fenótipo desse indivíduo.

Indivíduo 33: sexo masculino, 6 anos e 6 meses, filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: Sem intercorrências gestacionais, parto cesáreo, a termo, com peso de 3.070 g, comprimento de 48,5 cm.

História familiar: Idade materna na concepção 32 anos. Mãe com FLP, fístula de lábio inferior, dificuldade de aprendizagem, ADNPM, atraso de fala, comportamento atípico.

Dados clínicos aos 6 anos e 1 mês: fácies atípico, FLP, ADNPM, dificuldade de aprendizagem e déficit intelectual (Figura 11). Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) mostrou duplicação da sonda SHOX (Xp22.33/Yp11.2) e deleção da sonda RBFA (18q23) (Quadro 5, Figuras 12, 13, 14 e 15) e MLPA para síndromes de microdeleção específicas (P064) foi normal.

Figura 11 - Aspectos faciais do indivíduo 33

MLPA	CNV	região/sonda
P036	Duplicação Deleção	Xp22.33/Yp11.2 (SHOX) 18q23 (RBFA)

CNV= variante de número de cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA); **MLPA**= sondas de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Quadro 5 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 33, região cromossômica e sonda MLPA

Figura 12- Indivíduo 33. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloômicas sem alterações (quadrados verdes), a duplicação da sonda SHOX (Xp22.33/Yp11.2) (quadrado vermelho acima da linha verde) e a deleção da sonda RBFA (18q23) (quadrado vermelho abaixo da linha verde)

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 13 - Localização genômica das sondas MLPA SHOX (Xp22.33) (GRCh38, hg38)

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 14 - Localização genômica das sondas MLPA SHOX (Yp11.2) (GRCh38, hg38)

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 15 - Localização genômica das sondas MLPA RBFA (18q23) (GRCh38, hg38)

O gene *SHOX* (OMIM*312865) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2018a), duplicado no indivíduo 33, está localizado na região pseudoautossômicaXp/Yp, como exemplificado nas Figuras 11 e 12. As regiões pseudo-autossômicas são regiões altamente conservadas, com homologia de sequências entre os cromossomos sexuais de mamíferos. Em humanos, eles residem nas extremidades dos cromossomos X e Y abrangem cerca de 2,7 Mb (PAR1) no cromossomo X e 0,33 Mb (PAR2) no cromossomo Y (TROPEANO et al., 2016; VALETTO et al., 2016). A expressão de genes contidos nessa região se dá a partir dos dois cromossomos X (tanto o ativo como o inativo) em meninas e pelos cromossomos X e Y em meninos, indicando que a região tem efeito nas anomalias cromossômicas sexuais (BERNASCONI; GARAVELLI, 2010). A região em que está localizado o gene *SHOX* é considerada um deserto gênico, com cerca de 750 kb de DNA genômico que contém várias sequências conservadas evolutivamente (THOMAS et al., 2009).

O gene *SHOX* é expresso em membros, nos arcos faríngeos, em células osteogênicas e fibroblastos da medula óssea, e está envolvido no crescimento e desenvolvimento esquelético. As deleções do gene *SHOX*, resultando em haploinsuficiência do gene, são bem descritas e causam a Discondrosteose de Léri-Weill (OMIM#127300) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2016a), caracterizada por baixa estatura e anormalidades esqueléticas variáveis (LERI; WEILL, 1929; DEPEYRE et al., 2019; MONZANI et al., 2019), incluindo mesomelia, metacarpos curtos, cúbito valgo e deformidade de Madelung (deformidade distal do rádio e ulna e dos ossos proximais do carpo) (GAHUNIA et al., 2009; THOMAS et al., 2009; NICOLosi; CARUSO-NICOLETTI, 2010; RAPPOLD et al., 2012; SEO et al., 2015; KURNAZ et al., 2018). Fenótipo mais severo é observado quando há perda de função de ambas as cópias do *SHOX*, resultando na displasia mesomélica de Langer (OMIM#249700) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2016c), caracterizada por aplasia severa de membros ou hipoplasia grave da ulna e da fíbula, espessamento e curvatura do rádio e tíbia, podendo resultar em deformidades de mãos e pés. A hipoplasia da mandíbula também é observada. A prevalência de haploinsuficiência do *SHOX* é 1: 2.000, e a alteração é mais frequentemente de origem materna,

sugerindo transmissão preferencial de mãe para filho (LERI; WEILL, 1929; LANGER, 1965; AUGER et al., 2016).

Duplicação do *SHOX* são raras e foram descritas em indivíduos tanto com estatura baixa, normal e alta (TROPEANO et al., 2016; VALETTO et al., 2016). Análise em bancos de dados genéticos (DGV, CLINVAR e DECIPHER) (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a; SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) mostrou quatro duplicações na região da sonda *SHOX* no Xp22.33 e uma duplicação no Yp11.2 em indivíduos normais. De acordo com dados do CLINVAR (2019) duplicações menores que 1 Mb envolvendo somente o gene *SHOX* ou o *SHOX* associado a outros genes, podem ter significado incerto, enquanto duplicações maiores que 1 Mb (1 Mb a 5 Mb ou maiores que 5 Mb) envolvendo o *SHOX* e suas regiões flangeadoras foram descritas como patogênicas. Dados de literatura mostram que as microduplicações são raras e podem causar baixa estatura idiopática (FUKAMI et al., 2015; BUNYAN et al., 2016), além de constituírem fator de risco para distúrbios do neurodesenvolvimento e para o transtorno do espectro do autismo (FUKAMI et al., 2015; BUNYAN et al., 2016; TROPEANO et al., 2016; BENITO-SANZ et al., 2017). De acordo com Auger et al. (2016), independentemente do mecanismo patogênico, as duplicações envolvendo o *SHOX* resultam em fenótipo mais leve quando comparado com os casos com deleções, tendo menor impacto no crescimento do esqueleto e, o fenótipo, geralmente, é mais leve no sexo feminino pela diferença dos níveis de estrogênio.

Ross, Brøndum Nielsen e Tümer (2009) descreveram uma menina com estenose aórtica, fissura palatina, atraso no desenvolvimento e atraso de linguagem e duplicação envolvendo o gene *SHOX* e sequências evolutivamente conservadas na região. A duplicação foi herdada de seu pai, fenotipicamente normal. De acordo com os autores não foi possível definir se as malformações eram independentes da duplicação ou se a duplicação potencializou a suscetibilidade a outros fatores de risco genéticos.

Em relação à sonda RBFA na região 18q23, deleções envolvendo o gene *RBFA* raramente foram descritas em indivíduos normais. No DGV (2019) há três deleções envolvendo o gene *RBFA* e outros genes vizinhos (*CTDP1*, *HSBP1L1*, *KCNG2*, *PQLC1*, *RBFA*, *TXNL4A*, *ADNP2*, *PARD6G-AS1* e *PQLC1*) em

indivíduos referidos como normais. Deleção envolvendo oito genes (*TXNL4A*, *ADNP2*, *RBFA*, *PQLC1*, *PARD6G*, *HSBP1L1*, *PARD6G-AS1*, *RBFA*) foi classificada como patogênica em dois indivíduos com atraso no desenvolvimento e em um indivíduo com microcefalia, fissura orofacial e deficiência intelectual. Deleção menor que 51pb do gene *RBFA* foi classificada como benigna em um indivíduo com baixa estatura, dismorfismo craniofacial, cardiopatia congênita e múltiplas luxações articulares (CLINVAR, 2019). Outras quatro deleções menores que 51pb, envolvendo múltiplos genes (*GALR1*, *MBP*, *NFATC1*, *ZNF236*, *CTDP1*, *ZNF516*, *TXNL4A*, *ADNP2*, *KCNG2*, *SALL3*, *RBFA*, *PQLC1*, *PARD6G*, *ATP9B*, *LINC00683*, *LINC01879*, *HSBP1L1*) foram consideradas patogênicas, causando a síndrome de Burn-McKeown (OMIM#608572). Mutação em homozigose ou heterozigose composta no gene *TXNL4A*, localizado na mesma região do gene *RBFA* (18q23), causa a síndrome de Burn-McKeown (OMIM#608572) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2015), caracterizada por atresia de coana, surdez neurossensorial, cardiopatia congênita e dismorfismo craniofacial típico (fissuras palpebrais estreitas, coloboma das pálpebras inferiores, ponte nasal proeminente, filtro curto, fissura de lábio e/ou fissura de palato e orelhas grandes e proeminentes (WIECZOREK et al., 2014). Apesar da proximidade da sonda *RBFA* com o gene *TXNL4A* (409pb) o indivíduo 33 não apresenta sinais clínicos da síndrome Burn-McKeown, o que pode ser justificado pela possível deleção de um único alelo no indivíduo.

Deleção 18q terminal é uma das anomalias cromossômicas autossômicas mais comuns, com uma incidência de 1 em 40.000 (IMATAKA et al., 2015). A maioria das alterações envolvendo o 18q são terminais e com pontos de quebra extremamente variáveis, situadas nos 30Mb distais do cromossomo (18q21.1→qter). As deleções do braço longo do cromossomo 18 são relativamente bem definidas e conhecidas como síndrome da deleção do 18q (OMIM#601808) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2018b). O espectro fenotípico é altamente variável e está relacionado com a extensão da região deletada (CODY et al., 2014; UTINE et al., 2014; WANG et al., 2018) e inclui déficit de crescimento, baixa estatura, microcefalia, dismorfismos orofaciais (formas leves de palato alto, palato arqueado, lábio inferior proeminente, fissura mediana, fissura de lábio e de palato), anomalias geniturinárias e de membros, anomalias menores, mielinização tardia, hipotonia, atraso no desenvolvimento, comprometimento de fala e de linguagem, deficiência intelectual e

atresia aural com deficiência auditiva (CODY et al., 2007; DOSTAL et al., 2009; MARGARIT et al., 2012; WANG et al., 2018). Dostal et al. (2009) revisando 11 artigos e 1 pôster, caracterizaram a extensão da del18q (7 Mb a 40 Mb) e compararam os pontos de quebra em indivíduos com del18q que apresentaram fissura orofacial sindrômica e anomalias palatinas, restringindo a região crítica de aproximadamente 5Mb para fissura de palato e outras malformações orofaciais na região 18q22.3-23, incluindo os genes *FBXO1*, *C18ORF55*, *CYB5A*, *FAUP1*, *C18ORF51*, *CNDP2*, *CNDP1*, *ZNF407*, *ZADH2*, *TSHZ1*, *ZNF516*, *FLJ44313*, *FLJ44881*, *ZNF236*, *MBP*, *GALR1* e *SALL3*. Deleções intersticiais proximais do braço longo do cromossomo 18 são menos comuns (CODY et al., 2007) e a região 18q12.2-q21.1 é crítica para a “síndrome da deleção 18q12.2-q21.1, recentemente reconhecida como uma nova entidade clínica (IMATAKA et al., 2015).

De acordo Cody et al. (2015), os dados da literatura mostram que não há dois indivíduos não relacionados com deleções simples que tenham a mesma regiões hemizigóticas do 18q deletada. Dessa forma, como não há uniformidade no genótipo, o fenótipo é altamente variável.

A presença de déficit de crescimento, baixa estatura, fissura de lábio e de palato, atraso no desenvolvimento, importante comprometimento de fala e de linguagem e deficiência intelectual, associados a anomalias faciais menores no indivíduo 33 permite considerar que a deleção da sonda RBFA pode estar associada ao fenótipo do indivíduo, podendo ser considerado o diagnóstico de síndrome da deleção do 18q para esse caso. Não foi possível esclarecer com a técnica utilizada se a coexistência da duplicação na região da sonda SHOX, poderia também estar influenciando o fenótipo.

Indivíduo 36: sexo feminino, 2 anos, filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: diminuição de líquido amniótico no quinto mês, feto com déficit pômbero-estatural, pré-termo, com peso de 2.000 g.

História familiar: Idade materna e paterna na concepção 24 e 27 anos, respectivamente. Mãe com FLP, fístula o lábio inferior, dificuldade de aprendizagem, ADNPM, atraso de fala, comportamento atípico.

Dados clínicos aos 2 anos: frontal proeminente, fendas palpebrais estreitas e inclinadas para cima, base e ponte nasal baixa, hipoplasia da face média (Figura

16), déficit pômdero-estatural pré e pós-natal, cardiopatia congênita (CIA+PCA), distúrbio de comportamento.

Figura 16 - Aspectos faciais do indivíduo 36

O indivíduo 36 apresentou sinais clínicos faciais menores associados à fissura de palato, cardiopatia congênita e distúrbio de comportamento. Os sinais clínicos apresentados são indicativos de síndrome velocardiofacial, no entanto o MLPA P064, com sondas específicas para região 22q11 não mostrou alteração. A análise das regiões subtelomérica (MLPA P036) mostrou duplicação da sonda F7 na região 13q34 (Quadro 6, Figuras 17 e 18).

MLPA	CNV	região/sonda
P036	Duplicação	13q34 (F7)

CNV= variante de número de cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA); **MLPA**= sondas de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Quadro 6 - CNV subtelomérica detectada no indivíduo 36, região cromossômica e sonda MLPA

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 17 - Localização genômica do F7. Bandas de acordo com o Ensembl

Figura 18 - Indivíduo 36. Gráfico da análise MLPA P036 ilustrando o conjunto de sondas subteloméricas sem alterações (quadrados verdes) e a duplicação da sonda F7 (quadrado vermelho) na região 13q34

De acordo com Jønchet al. (2012), duplicações e deleções parciais do braço longo do cromossomo 13q são anormalidades estruturais incomuns e estão associadas a uma ampla variabilidade clínica, dependendo do tamanho e da região cromossômica envolvida. Duplicações parciais da parte distal do cromossomo 13q (13q14-qter) são raras e o fenótipo resultante se assemelha ao da trissomia completa 13 (HELALI et al., 1996; JØNCH et al., 2012). As características craniofaciais incluem microcefalia, orelhas baixas, sobrancelhas grossas, cílios longos e enrolados, hipotelorismo, ponte nasal proeminente, palato alto, filtro labial longo e vermelhão fino do lábio superior (JØNCH et al., 2012). Dados do DGV, CLINVAR e DECIPHER (CENTRE FOR APPLIED GENOMICS, 2016; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a; SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018) mostram que duplicações maiores que 5Mb na região são patogênicas enquanto duplicações envolvendo 1 a 11 genes foram consideradas de significado incerto. Os dados do DGV e CLINVAR mostraram a ocorrência de duplicação envolvendo o gene *F7* em dois indivíduos fenotipicamente normais. No entanto, variante de ganho de número de cópias abrangendo o *F7* foi descrita em indivíduo com atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, comportamento do espectro do autismo e atraso de fala e de linguagem expressiva, fissura labiopalatina e fácies anormal (SANGER INSTITUTE GENOME RESEARCH, 2018). O gene *F7* codifica o fator VII de coagulação, que é o zimogênio da protease sérica FVIIa, uma glicoproteína dependente da vitamina K

que participa da via extrínseca da coagulação sanguínea (O'HARA et al., 1987; SALINAS-TORRES et al., 2018). A deficiência de FVII é um distúrbio de sangramento autossômico recessivo com gravidade variável, dependendo dos níveis e atividade do antígeno de FVII. A deficiência completa de FVII está associada a uma diátese hemorrágica grave, mas, nas formas menos graves, as principais manifestações clínicas são epistaxes recorrentes, hematomas em contusões menores e menorragia (MILLAR et al., 2000; RICCARDI et al., 2015).

Pela metodologia utilizada não é possível estabelecer o tamanho da duplicação na região subtelomérica do 13q, no entanto o indivíduo 36 não apresentou fenótipo facial característico da trissomia completa do cromossomo 13, como observado nos rearranjos microscópicos, sugerindo uma alteração menor. Em comum com os indivíduos com variantes de número de cópias envolvendo a região da sonda *F7*, o indivíduo 36 apresentou a fissura e o distúrbio de comportamento. Ele apresenta ainda, cardiopatia congênita, uma anomalia maior que associada à fissura de palato é indicativo de quadro sindrômico. Para esclarecimento etiológico desse caso e, orientação mais adequada à família é necessário exame mais refinado, como aCGH.

4.2.2 Descrição clínica e análise MLPA dos indivíduos 41 e 46

A análise de MLPA para síndromes de microdeleção conhecidas (P064) detectou deleção na região 22q11 nos indivíduos 41 e 46. Em ambos os casos, a alteração foi confirmada por meio de kit específico para essa região (P250) (Figura19). Localização genômica da região 22q11.2 está ilustrada na Figura 20.

Figura 19 - Gráfico da análise MLPA P064 ilustrando o conjunto de sondas subteloôméricas na região 22q11 (a). Quadrados verdes representam as sondas sem alteração (duas cópias do gene) e os quadrados vermelhos, a deleção das sondas DGCR8, CLTCL1, ZNF74, GNB1L, SNAP29, MED15, CDC45 (uma cópia do gene). A figura à esquerda (b) representa a confirmação da deleção por meio da análise MLPA P250 (sondas DGCR8, HIRA, TBX1_1, CLTCL1, CLDN5, ZNF74, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, MED15, 10p14.4, SNAP29, LZTR1, CDC45L) (quadrados vermelhos)

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 20 - Localização genômica da região 22q11.2 (chr22:20,982,013-20,999,038). Bandas de acordo com o UCSC

Abaixo segue a descrição clínica de ambos os casos separadamente. A discussão dos casos foi realizada em conjunto.

Indivíduo 41: sexo masculino, 11 anos, segundo filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: sem intercorrências gestacionais, parto normal, a termo, com peso de 3.000 g e 48 cm de comprimento.

História familiar: Idade materna na concepção 31 anos.

Dados clínicos aos 11 anos: estreitamento bitemporal, fâcies grosseira, alongada, sobrancelhas varridas no terço lateral, fendas palpebrais discretamente estreitas, olhos proeminentes, hipertelorismo ocular, base, ponte e ponta nasais largas, orelhas pequenas e anômalas com hélices largos e dobrados (Figura 21), cardiopatia congênita, criptorquidia, dificuldade de aprendizado. Cariótipo de bandamento G normal. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) foi normal e para síndromes de microdeleção específicas (P064) mostrou deleção da região 22q11 (Figura 19a). A deleção foi confirmada por MLPA P250, que contém 14 sondas específicas para região 22q.11 (DGCR8, HIRA, TBX1_1, CLTCL1, CLDN5, ZNF74, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, MED15, 10p14.4, SNAP29, LZTR1, CDC45L) (Figura 19b).

Figura 21 - Aspectos faciais do indivíduo 41, aos 4 anos de idade

Indivíduo 46: sexo masculino, 13 anos, filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: sem intercorrências gestacionais, parto normal, a termo, com peso de 3.100 g e 48 cm de comprimento.

História familiar: Idade materna e paterna na concepção 17 e 25 anos, respectivamente.

Dados clínicos aos 13 anos: baixa estatura, frente estreita, fendas palpebrais estreitas, nariz alongado, base e ponte nasais altas e largas, boca pequena, retrognatia, hipoplasia do arco zigomático e da face média, FLP, orelhas pequenas e proeminentes, anti-hélices simplificados (Figura 22), dificuldade de aprendizagem. Apresenta traço de anemia falciforme. Cariótipo de bandamento G normal. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) foi normal e para síndromes de microdeleção específicas (P064) mostrou deleção da região 22q11.2. A deleção foi, confirmada por MLPA P250, que contém 14 sondas específicas para região 22q11.2 (DGCR8, HIRA, TBX1_1, CLTCL1, CLDN5, ZNF74, GP1BB, TXRND2, TBX1_2, KLHL22, MED15, 10p14.4, SNAP29, LZTR1, CDC45L) (Figura 19).

a= frente; b= perfil esquerdo; c= perfil direito.

Figura 22 - Aspectos faciais do indivíduo 46

A síndrome de deleção 22q11.2 (SD 22q11.2) é a variante de número de cópias mais frequente (CNV) que afeta aproximadamente 1/1.000 fetos e 1/2.000-4.000 crianças, resultando em achados reconhecíveis, mas variáveis, em múltiplos sistemas orgânicos, incluindo anomalias cardíacas, anormalidades palatinas (insuficiência velofaríngea, fissura de lábio e/ou palato); imunodeficiência e doença autoimune, endocrinopatias (hipoparatiroidismo com hipocalcemia resultante, disfunção tireoidiana, deficiência de hormônio do crescimento), diferenças geniturinárias e gastrointestinais e anormalidades do desenvolvimento neurológico (atrasos cognitivos e envolvimento neuropsiquiátrico) (MCDONALD-MCGINN et al., 2013).

Embora a deleção 22q11.2 seja importante causa de morbidade e mortalidade ao longo da vida, nenhuma agência governamental de saúde no mundo iniciou uma rotina de triagem neonatal, perpetuando relatos de famílias que continuam a atravessar uma odisseia diagnóstica, em muitos casos por um período prolongado e muitas vezes com consequências adversas (MCDONALD-MCGINN, 2018; PALMER et al., 2018). A prevalência geral de problemas médicos significativos varia de acordo com a idade e o foco muda ao longo do tempo. Na primeira infância há atenção a defeitos congênitos, problemas médicos associados, marcos motores e da fala e linguagem. Na idade escolar, as famílias e os cuidadores mudam a ênfase para os aspectos acadêmicos e as relações entre pares, enquanto nos adolescentes e na idade adulta, todo o foco muda principalmente para as discussões em torno da independência, diferenças comportamentais e risco de recorrência (MCDONALD-MCGINN, 2018; VO; MCNEILL; VOGT, 2018).

A deleção 22q11.2 típica é um segmento de 3 Mb abrangendo LCR A-D e ocorre em mais de 85% dos casos, enquanto uma deleção menor de 1,5 Mb abrangendo LCR A-B compreende aproximadamente 10% dos casos. O fenótipo para ambas as deleções é indistinguível e é o típico da síndrome. As deleções da LCR C-D são relativamente raras, e o fenótipo associado ainda não é bem caracterizado. Na deleção típica, aproximadamente 71% dos casos apresentam anomalias palatinas, incluindo insuficiência velofaríngea (42%), fissura palatina submucosa (16%), e fissura de palato (11 a 16%) (KAMINSKY et al., 2011; MCDONALD-MCGINN; SULLIVAN, 2011). De acordo com Vieira et al. (2015) e Panamonta et al. (2016), casos de fissura palatina com presença de sinais clínicos adicionais da síndrome de deleção 22q11.2, como face longa, pálpebras encapuzadas, nariz típico, insuficiência velofaríngea, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, dificuldades de aprendizagem, cardiopatias congênitas conotruncais, fácies, imunodeficiências, hipoparatiroidismo e distúrbios neuropsiquiátricos, é indicativo o teste da deleção 22q11.2.

Os indivíduos 41 e 46 apresentaram quadro clínico atípico para a deleção do 22q11, o que dificultou o diagnóstico clínico da SD22q11. Sinais clínicos comuns na deleção do 22q11, como dificuldade de aprendizagem e cardiopatia, presente nos indivíduos, também são característicos de outras síndromes craniofaciais. O padrão facial (*facial gestalt*) dos indivíduos, no entanto, não é, reconhecidamente, típico

para a síndrome da deleção do 22q11.2. Em cada um dos indivíduos, a combinação de sinais clínicos faciais menores foi diferente. Outro achado que dificultou o diagnóstico clínico foi a presença de fissura de lábio e palato, achado incomum para esse diagnóstico.

A fissura de lábio com ou sem fissura de palato é observada em apenas 2% dos casos (MCDONALD-MCGINN; SULLIVAN, 2011; SANDRI, 2011). Sandri (2011) observou deleção de 2Mb dentro da região típica de 3Mb no 22q11 em uma menina (6 meses de idade) com fissura de lábio e palato sem outros sinais clínicos da síndrome da deleção do 22q11. A mãe da criança, no entanto, apresentou sinais clínicos da síndrome da deleção do 22q11.2, incluindo voz hipernasalizada, atraso na aquisição da fala e dificuldade de aprendizagem, sendo portadora da mesma deleção. De acordo com o autor, a presença de fissura de lábio e palato em um indivíduo com deleção do 22q11 demonstra a importância de incluir esse tipo de fissura no critério de diagnóstico. Outro caso de deleção 22q11.2 com fissura de lábio e palato foi relatado por Williams et al. (2016).

Segundo McDonald-McGinn et al. (2013) a variabilidade fenotípica observada em indivíduos com SD 22q11.2 pode ser devida a variantes adicionais no cromossomo não deletado, que, em alguns casos, desmascaram uma condição autossômica recessiva e, em outros casos, simplesmente contribui para a presença de achados atípicos. Variantes em um único gene, como, por exemplo, no gene *SNAP29*, são um dos principais modificadores da expressividade variável em indivíduos com SD de 22q11.2. De acordo Panamonta et al. (2016) os indivíduos com deleção do 22q11 que apresentem fenótipo atípico exigem que o clínico considere a possibilidade de um diagnóstico concomitante, como uma condição genética relacionada à causada pela microdeleção 22q11.2 ou, uma condição etiologicamente independente.

Pela metodologia utilizada (MLPA P064 e P250) não foi possível identificar se a deleção da região 22q11.2 estava além dos limites das sondas, o que poderia justificar o fenótipo atípico ou se havia um rearranjo complexo envolvendo outras regiões cromossômicas. Nenhuma outra síndrome monogênica pode ser considerada para os indivíduos 41 e 46.

Devido ao fenótipo atípico relacionado à deleção do 22q11.2 nos indivíduos 41 e 46 sugere-se que indivíduos com fissura de lábio e palato com dificuldade de

aprendizagem, com ou sem atraso no desenvolvimento e/ou distúrbio de comportamento, sejam testados para deleção do 22q11.2 por meio da técnica de MLPA P064 e/ou P250 para triagem da deleção e, quando possível, pela técnica de aCGH para definição do ponto ou pontos de quebra, para melhor manejo do indivíduo e orientação adequada para família.

4.3 INDIVÍDUOS COM MLPA P036 E P064 NORMAIS QUE TIVERAM EXAMES ADICIONAIS ALTERADOS, POSTERIORES A ANÁLISE DE MLPA DESSE ESTUDO

Durante o decorrer desse estudo, dois participantes (Caso 20 e 50) que não apresentaram deleção ou duplicação pela técnica de MLPA tiveram a possibilidade de realizar exames adicionais através de recursos próprios ou em outros serviços de saúde. Os dados clínicos dos indivíduos, os resultados dos exames adicionais, bem como, sua correlação com o fenótipo, foram dispostos abaixo.

Caso 20: sexo masculino, 2 anos e 7 meses.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: hipertensão arterial materna durante toda a gestação sendo necessário uso de medicamento, parto cesáreo, a termo, com peso de 3.400 g e 49 cm de comprimento.

História familiar: Idade materna e paterna na concepção 35 e 42 anos, respectivamente. O filho mais velho do casal foi referido como normal.

Dados clínicos aos 2 anos e 7 meses: crânio grande, sobrancelhas grossas, fendas palpebrais amplas, olhos grandes, FLP, base e ponte nasal largas, orelhas grandes, dígitos alongados (Figura 23), displasia de quadril, sobreposição de artelhos, ADNPM, atraso na aquisição da fala e da linguagem, distúrbio de comportamento (movimentos repetitivos). Cariótipo com bandamento G mostrou 46,X,Yqh-. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) e para síndromes de microdeleção específicas (P064) foi normal. Pesquisa molecular de cromossomo X-Frágil por meio da reação em cadeia da polimerase sensível a metilação e triplet-primed PCR mostraram padrão de picos compatível com mutação completa, isto é, acima de 200 repetições CGG. Análise da

região de sítio frágil na mãe do indivíduo20 mostrou a presença de um alelo com 20 repetições e um alelo com 80 repetições, este último caracterizando a pré-mutação.

Figura 23 - Aspectos faciais do indivíduo 20

O caso 20 apresentou importante distúrbio de comportamento associado à fissura de lábio e palato. De acordo com informações fornecidas pela família posteriormente ao exame de MLPA, devido a alguns comportamentos típicos como rodar em volta do eixo do próprio corpo, movimentos repetitivos, e “flap”, foi indicado investigação de sítio-frágil na região do Xq27.3. A análise mostrou expansão de trinucleotídeos CGG (mais de 200 repetições) na região 5’ não traduzida do gene *FMR1* (*fragile-X mental retardation 1*) (Figura 24), possibilitando o diagnóstico molecular da síndrome do X-frágil para esse indivíduo.

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 24 - Localização genômica do gene *FMR1* (chrX:147,909,431-147,911,817). Bandas de acordo com o UCSC

A síndrome do X-frágil é a causa mais comum de deficiência intelectual em meninos (SAUL; TARLETON, 2012), afetando 1 em 4.000-5.000 indivíduos do sexo masculino e 1 em 4.000-8.000 no sexo feminino, respondendo por aproximadamente 2% dos diagnósticos de deficiência intelectual (HAGERMAN et al., 2017). Além da

deficiência intelectual, os indivíduos afetados também apresentam macrocefalia, face longa, frontal e queixo proeminentes, orelhas salientes, frouxidão articular, macroorquidia após a puberdade, hipersensibilidade a estímulos sensoriais, hiperatividade, distúrbios do sono, problemas motores, convulsões e transtorno do espectro do autismo (HOYOS; THAKUR, 2017; D'ANNESSA; CICCONARDI; DI MARINO, 2019). Aproximadamente 50% dos meninos e 20% das meninas com síndrome do X-frágil têm diagnóstico de transtorno do espectro autismo (KAUFMANN et al., 2017). Fissura orofacial não é um achado comum na síndrome do X-frágil (LACHIEWICZ et al., 1991; LOESCH; HAY; SHEFFIELD, 1992; GIAMPIETRO et al., 2006).

Na maioria dos casos, a síndrome do X-Frágil ocorre devido à expansão dos trinucleotídeos CGG localizado na região 5' não traduzida do gene *FMR1*. Em indivíduos normais as repetições de trinucleotídeos CGG variam de 5 a 55, mas podem se expandir devido a erro de alinhamento entre os cromossomos X, na linhagem materna, resultando em crossing-over desigual (D'ANNESSA; CICCONARDI; DI MARINO, 2019). O American College of Medical Genetics and Genomic classifica as expansões CGG em normais (5 a 44 repetições), intermediárias (45 a 54 repetições), pré-mutação (55 a 200 repetições) e mutação completa (mais de 200 repetições). A mutação completa leva à hipermetilação na ilha CpG da sequência repetitiva e, conseqüentemente, a inativação do gene *FMR1*. O silenciamento transcricional do gene *FMR1* leva a ausência da proteína FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein*), a qual está envolvida em diferentes etapas do metabolismo do mRNA, incluindo estabilidade, maturação, transporte e tradução. A FMRP é expressa em todos os tecidos, sendo altamente expressa em testículos, ovários e cérebro. Ela interage com outras proteínas, mRNAs, microRNAs e pequenos RNAs não-codificantes, sendo essencial durante o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso e, ainda, na plasticidade sináptica, um processo subjacente à aprendizagem e à memória (HOYOS; THAKUR, 2017; D'ANNESSA; CICCONARDI; DI MARINO, 2019). Na síndrome do X-frágil, a desregulação da síntese da proteína durante o desenvolvimento de sinapses, afeta o processo e plasticidade cerebral, levando à deficiência intelectual (HOYOS; THAKUR, 2017).

A prevalência da pré-mutação varia de aproximadamente 1 em 250 a 1 em

813 homens e aproximadamente 1 em 110 a 1 em 270 mulheres (TASSONE et al., 2012; HUNTER et al., 2014; HAGERMAN et al., 2017). O mecanismo patogênico para a pré-mutação (55 a 200 repetições) é diferente. Em portadores da pré-mutação, o gene não é silenciado, mas ocorre aumento na transcrição de RNA do *FMR1*, proporcionalmente relacionado ao número de repetições CGG e redução na tradução do RNAm para proteína FMR1 (ganho de função). O excesso de RNAm leva a desregulação da expressão de diversas proteínas e, ainda, a inclusão celular desse RNAm em diversos tecidos, tais como sistema nervoso central e periférico, células pituitárias e células de Leydig, entre outras (KENNEDY; WARREN, 2001; KENNEDY et al., 2001; HOYOS; THAKUR, 2017). Aproximadamente 20% das mulheres com pré-mutação desenvolverão insuficiência ovariana primária associada ao X-frágil (SHERMAN; PLETCHER; DRISCOLL, 2005; HAGERMAN et al., 2017). As portadoras da pré-mutação apresentam, ainda, risco para outras comorbidades, incluindo várias condições neurológicas, psiquiátrica, reprodutivas, endócrinas e autoimunes (HOYOS; THAKUR, 2017; D'ANNESSA; CICCONARDI; DI MARINO, 2019). Cerca de 40% dos indivíduos do sexo masculino e 16% dos indivíduos do sexo feminino (50 anos ou mais) portadores da pré-mutação desenvolverão síndrome de tremor/ ataxia associada ao X-frágil, um distúrbio cerebelar neurodegenerativo progressivo com ataxia da marcha e tremor intencional, ataxia cerebelar, neuropatia e declínio cognitivo (HOYOS; THAKUR, 2017; HAGERMAN; HAGERMAN, 2016; HAGERMAN et al., 2017; D'ANNESSA; CICCONARDI; DI MARINO, 2019). Depressão, ansiedade, hipertensão, síndrome das pernas inquietas, apneia do sono, enxaqueca, fibromialgia e hipotireoidismo são mais comuns em portadores de pré-mutação (HAGERMAN; HAGERMAN, 2016).

Há ainda casos nos quais alguns indivíduos com síndrome do X-Frágil apresentam mosaicismos para as repetições CGG, com algumas células contendo alelos com mutação completa e outras contendo alelos de pré-mutação. Outros indivíduos com síndrome do X-Frágil, podem, ainda, ter mosaicismos de metilação, com algumas células contendo alelos *FMR1* metilados e outras células com alelos *FMR1* não metilados. Ambos os tipos de mosaicismos produzirão a proteína FMRP, de modo que esses indivíduos possam ter distúrbios cognitivos e comportamentais menos severos do que aqueles com a mutação completa (completamente metilada), nos quais a FMRP está ausente (HAGERMAN et al., 2017).

O caso 20 do presente estudo apresentou mais de 200 repetições da tríade CGG, caracterizando o diagnóstico da síndrome do X-frágil. A pouca idade do indivíduo (2 anos e 7 meses na última avaliação genético-clínica), associada ao conjunto de sinais clínicos inespecíficos (fissura de lábio e palato, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e distúrbio de comportamento) dificultaram o diagnóstico clínico. Como aproximadamente 30% das crianças com a síndrome do X-frágil não apresentam sinais clínicos dismórficos óbvios, o geneticista, muitas vezes, depende de características comportamentais para fazer o diagnóstico clínico (HAGERMAN, 2002). A síndrome do X-Frágil geralmente não é diagnosticada antes dos 8-9 anos de idade (BAILEY et al., 2009). A idade média de diagnóstico da síndrome do X-frágil nos Estados Unidos é de 3 anos, uma vez que as características físicas típicas da síndrome são variáveis e as manifestações clínicas podem ser bastante atenuadas ou estarem ausentes (BAILEY et al., 2009; HAGERMAN et al., 2017; RAY et al., 2017). Os sinais faciais e comportamentais se tornam mais acentuados na puberdade (BAILEY et al., 2009; HAGERMAN et al., 2017; RAY et al., 2017). Bailey et al. (2009) e Hagerman et al. (2017) consideram que, como o atraso de linguagem é a apresentação inicial na maioria das crianças, o teste para X-frágil deve ser indicado para crianças que não estão falando aos 2 a 3 anos de idade.

O transtorno do espectro do autismo (TEA) está fortemente associado à síndrome do X-frágil. Aproximadamente 2 a 6% dos indivíduos com TEA têm a síndrome do X-frágil e 50 a 60% dos indivíduos do sexo masculino com síndrome do X-frágil têm TEA. Muitos dos RNAm regulados pela proteína FMRP são produtos de genes que estão associados ao TEA e, conseqüentemente, a deficiência da proteína leva a uma desregulação de muitas vias associadas ao TEA e algumas evidências sugerem que a proteína é deficiente nos cérebros de indivíduos com TEA (FATEMI et al., 2010; DARNELL et al., 2011; IOSSIFOV et al., 2012; FATEMI et al., 2013; BOLAND et al., 2017; HAGERMAN et al., 2017).

A definição do diagnóstico molecular posterior ao teste de MLPA realizado nesse estudo mostra a importância do seguimento do indivíduo com distúrbio de comportamento pelo geneticista clínico e pela equipe interdisciplinar para que, com a melhor caracterização do comportamento apresentado, haja o direcionamento adequado do teste molecular e, conseqüentemente, a finalização da odisseia

diagnóstica enfrentada pelas famílias. O diagnóstico correto para esse indivíduo direciona, ainda, o manejo adequado com indicação de terapias cognitivas, atenção especial na escola e, possivelmente, no futuro uso de medicamento psiquiátrico se necessário. Dados da literatura mostram que o indivíduo com X-frágil necessita de várias terapias, incluindo intervenção precoce de fala e linguagem, fisioterapia e terapia ocupacional com uma abordagem de integração sensorial (UTARI et al., 2010; HAGERMAN et al., 2017). Se o diagnóstico for feito aos 2 anos, a criança se beneficiará com a aplicação do modelo de intervenção precoce de Denver (DAWSON et al., 2010, 2012) ou outra forma de intervenção de análise comportamental aplicada. O manejo das manifestações comportamentais também pode incluir terapias farmacológicas, com uso de medicamentos psicotrópicos convencionais que incluem estimulantes, inibidores seletivos da recaptação da serotonina e, em alguns casos, antipsicóticos (SHERMAN; PLETCHER; DRISCOLL, 2005; HAGERMAN et al., 2009; WIROJANAN et al., 2009; TORRIOLI et al., 2010; HAGERMAN et al., 2017).

A mãe do indivíduo 20, portadora da pré-mutação não apresentou, até o momento desse estudo, nenhum sinal clínico associado à expansão de trinucleotídeos. Por ser portadora da pré-mutação e apresentar risco potencial de aumento da expansão recebeu aconselhamento genético adequado. As mulheres que são portadoras de pré-mutação têm um risco de 50% de transmitir um alelo anormal (pré-mutação ou mutação completa) em cada gestação. Em geral, o risco de uma pré-mutação materna se tornar uma mutação completa na transmissão para sua prole está correlacionado com o número de repetições de trinucleotídeos CGG na pré-mutação. Para pequenas pré-mutações, a interrupção das repetições de CGG por repetições ocasionais de AGG pode ajudar a avaliar o risco de expansão do CGG para uma mutação completa durante a transmissão de mãe para filho. Nesse sentido, a presença de interrupções do AGG, além do número de repetições CGG e da idade materna, tem um papel no risco de repetição da expansão durante a transmissão e deve ser incorporada ao processo de aconselhamento genético (NOLIN et al., 2011; YRIGOLLEN et al., 2012; NOLIN et al., 2013; YRIGOLLEN et al., 2014). Aproximadamente 16% das transmissões maternas de um alelo intermédio (45 a 54 repetições) podem ocasionalmente ter uma pequena variação no tamanho da repetição (isto é, uma alteração de 1 ou 2 repetições) e os filhos estão

em risco insignificante de serem afetados. Alelos intermediários variando de 50 a 54 repetições podem ser um pouco mais instáveis do que aqueles com menos de 50 repetições e, potencialmente podem se tornar uma pré-mutação (>55 repetições) (NOLIN et al., 2011). Os indivíduos diagnosticados com síndrome do X-frágil geralmente têm muitos membros da família com alelos de pré-mutação ou mutação completa (TASSONE; HALL, 2012; HAGERMAN et al., 2017).

Caso 48: sexo masculino, 2 anos e 6 meses, filho de casal não consanguíneo.

Dados gestacionais, perinatais e familiares: sem intercorrências gestacionais, pré-termo, com peso de 2.800 g e 45,5 cm de comprimento.

História familiar: Idade materna e paterna na concepção 36 e 42 anos, respectivamente.

Dados clínicos aos 2 anos e 6 meses: discreto estreitamento bitemporal, aparente hipertelorismo ocular, cílios longos, epicanto bilateral, FLP (Figura 25), forame oral pérvio, ADNPM, atraso na aquisição da fala e de linguagem, déficit pândero-estatural. Cariótipo de bandamento G normal. Análise de microrrearranjos por meio da técnica de MLPA para região subtelomérica (P036) e para síndromes de microdeleção específicas (P064) foram normais. Análise de microrrearranjos pela técnica de SNParray e marcadores não polimórficos, realizado mostrou duplicação intersticial de 426 kb no cromossomo X com as seguintes coordenadas GRCh37/hg19 Xq 27.2 [chrX:140,353,243-140,779,447]x2 (Figura 26).

a= frente; b= perfil esquerdo; c= perfil direito

Figura 25 - Aspectos faciais do indivíduo 48

Fonte: <http://genome.ucsc.edu> (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ, 2018).

Figura 26 - Localização genômica da região deletada (chrX:140,353,243-140,779,447). Bandas de acordo com o UCSC

O indivíduo 48 apresentou sinais clínicos faciais menores, fissura de lábio e palato e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e atraso na aquisição da fala. A análise de MLPA P036 e P64 foi normal e o array de SNP mostrou duplicação pequena de aproximadamente 426 pares de bases envolvendo os genes *SPANXA2-OT1*, *SPANXA1*, *SPANXA2* e *LOC645188*.

Análise no banco de dados ClinVar (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018a) mostra variações pequenas envolvendo essa região classificada como benigna ou provavelmente benigna. Em um indivíduo com três cópias da região GRCh37/hg19 Xq27.2 [chrX:140,353,121-140,738,390], envolvendo os mesmos genes duplicados no caso 50, considerada como provavelmente benigna, foi observado atraso no desenvolvimento. Em outro indivíduo com a duplicação (duas cópias e, provavelmente, sexo masculino), considerada benigna, foi observado cardiopatia congênita complexa.

A proteína espermática humana associada ao núcleo dos genes do cromossomo X (*SPANX*, *Sperm Protein Associated with the Nucleus*, X) compreende uma família de quatro genes (*SPANXA1* (OMIM*300305) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2007a), *SPANXA2* (OMIM*300493) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2014), *SPANXC* (OMIM*300330) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2007b) e *SPANXD* (OMIM*300670) (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2007c) que codificam antígenos específicos de câncer/testículos que são alvos potenciais para imunoterapia no câncer. Esses genes parálogos, altamente semelhantes, se agrupam no cromossomo X em Xq27.2, dentro de uma região de aproximadamente 800 kb (WESTBROOK et al., 2000; KOUPRINA et al., 2004). O *SPANXA1*, é mais frequentemente expresso em linhagens celulares de melanoma e glioblastoma (ZENDMAN et al., 2003). O *SPANXA2-OT1* (*SPANXA2 Overlapping Transcript 1*) é um gene de RNA não-codificante e o *LOC645188* é um gene codificador de proteína não caracterizado com expressão restrita ao testículo (STELZER et al., 2016).

A presença da duplicação Xq27.2 em indivíduos normais e a inespecificidade dos achados clínicos nos dois indivíduos descritos com essa alteração e fenótipo anormal (atraso no desenvolvimento e cardiopatia), caracterizou essa variação como benigna. O caso 48 desse estudo também apresenta achados inespecíficos (atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, cardiopatia congênita e atraso na aquisição de fala) associados à fissura de lábio e palato que, embora sejam sugestivos de quadro sindrômico, nesse momento, não há subsídios suficientes para considerar essa microduplicação (426pb) como o fator etiológico. Dessa forma, mesmo com a realização de exame mais refinado do que o cariótipo e o MLPA não foi possível finalizar a odisseia diagnóstica desse caso. O seguimento genético clínico com vistas a sinais adicionais informativos associados à possível realização de sequenciamento de nova geração (exoma ou genoma completos) para identificação de variações gênicas, faz se necessário para elucidar a etiologia nesse caso.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos nesse estudo foi possível concluir que:

- cerca de 11% dos indivíduos com anomalias craniofaciais complexas, com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala e/ou distúrbio de comportamento, com cariótipo normal têm alteração (ões) submicroscópicas;
- o MLPA P036 permite a identificação de alterações submicroscópicas em indivíduos com anomalia craniofacial complexa, no entanto, não permite completa correlação genótipo/fenótipo devido a sua ineficiência em definir se há alterações em sondas adjacentes e, consequentemente, o tamanho e os pontos de quebra dos rearranjos cromossômicos;
- a utilização da técnica de MLPA P036, em indivíduos com anomalias craniofaciais complexas pode ser aplicada como uma **triagem inicial** de microrrearranjos cromossômicos. No entanto, para o diagnóstico preciso, correlação do genótipo e fenótipo e, consequentemente, manejo adequado do indivíduo é necessário o emprego de técnicas moleculares mais refinadas (aCGH, estudo de sequências repetitivas e/ou metilação e sequenciamento de nova geração);
- o teste MLPA P064 permite identificar deleções na região 22q11.2 em indivíduos com fenótipo craniofacial complexo, sem o fenótipo clássico da síndrome da deleção 22q11.2;
- o teste MLPA P064, bem como, a confirmação pelo P250, não permitiram esclarecer se outras regiões no 22q11, adjacentes as sondas utilizadas no nesses kits, estavam influenciando o fenótipo, no entanto, a utilização do MLPA P064 permitiu definir o diagnóstico e, consequentemente, melhorar o manejo do indivíduo;
- o teste MLPA P064 pode ser útil na identificação da deleção do 22q11 em indivíduos fissura de lábio (com ou sem palato) associada a atraso na aquisição da fala e distúrbio de comportamento, sem fácies típico da

deleção do 22q11, podendo ser incluído na **rotina de diagnóstico molecular** do HRAC;

- a identificação das alterações submicroscópicas pela técnica de MLPA P036 e P064, nesse casuística, permite o aconselhamento genético mais adequado as famílias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abdollahi Fakhim S, Shahidi N, Lotfi A. Prevalence of associated anomalies in cleft lip and/or palate patients. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2016;28(85):135-9.
- Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet*. 2007;5:8-9.
- Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odièvre M, Dommergues JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr*. 1987;110(2):195-200.
- Alesi V, Orlando V, Genovese S, Loddo S, Pisaneschi E, Pompili D, et al. Interstitial 10q21.1q23.31 duplication due to meiotic recombination of a paternal balanced complex rearrangement: cytogenetic and molecular characterization. *Cytogenet Genome Res*. 2017;151(4):179-85.
- Algar EM, St Heaps L, Darmanian A, Dagar V, Prawitt D, Peters GB, et al. Paternally inherited submicroscopic duplication at 11p15.5 implicates insulin-like growth factor II in overgrowth and Wilms' tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007;67(5):2360-5. Epub 2007 Feb 26.
- Altunhan H, Annagür A, Konak M, Ertuğrul S, Ors R, Koç H. The incidence of congenital anomalies associated with cleft palate/cleft lip and palate in neonates in the Konya region, Turkey. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012;50(6):541-4.
- Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(13):1431-41.
- Auger J, Baptiste A, Benabbad I, Thierry G, Costa JM, Amouyal M, et al. Genotype-phenotype relationship in patients and relatives with SHOX region anomalies in the French population. *Horm Res Paediatr*. 2016;86(5):309-18.
- Bailey DB Jr, Raspa M, Bishop E, Holiday D. No change in the age of diagnosis for fragile x syndrome: findings from a national parent survey. *Pediatrics*. 2009;124(2):527-33.
- Balikova I, Menten B, Ravel T, Caignec C, Thienpont B, Urbina M, et al. Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat*. 2007;28(10):958-67.
- Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):56-68.

Basha M, Demeer B, Revencu N, Helaers R, Theys S, Bou Saba S, et al. Whole exome sequencing identifies mutations in 10% of patients with familial non-syndromic cleft lip and/or palate in genes mutated in well-known syndromes. *J Med Genet*. 2018;55(7):449-58.

Bendavid C, Dubourg C, Pasquier L, Gicquel I, Le Gallou S, Mottier S, et al. MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in Holoprosencephaly. *Hum Mutat*. 2007;28(12):1189-97.

Benito-Sanz S, Belinchon-Martínez A, Aza-Carmona M, de la Torre C, Huber C, González-Casado I, et al. Identification of 15 novel partial SHOX deletions and 13 partial duplications, and a review of the literature reveals intron 3 to be a hotspot region. *J Hum Genet*. 2017;62(2):229-34.

Bernasconi S, Garavelli L. A short history of the initial discovery of the SHOX. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(6 Suppl):3-6.

Beuren AJ, Shulze C, Eberle P, Harmanjanz D, Apitz J. The syndrome supravalvular aortic stenosis, peripheral pulmonary stenosis, mental retardation and similar facial appearance. *Am J Cardiol*. 1964;13:471-82.

Blasco MA, Gasser SM, Lingner J. Telomeres and telomerase. *Genes Dev*. 1999;13(18):2353-9.

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

Boland MJ, Nazor KL, Tran HT, Szücs A, Lynch CL, Paredes R, et al. Molecular analyses of neurogenic defects in a human pluripotent stem cell model of fragile X syndrome. *Brain*. 2017;140(3):582-98.

Bragin E, Chatzimichali EA, Wright CF, Hurles ME, Firth HV, Bevan AP, et al. DECIPHER: database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D993-D1000.

Bueno A, Rodríguez-López R, Reyes-Palomares A, Rojano E, Corpas M, Nevado J, et al. Phenotype-locus associations in networks of patients with rare disorders: application to assist in the diagnosis of novel clinical cases. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(10):1451-61.

Bunyan DJ, Baffico M, Capone L, Vannelli S, Iughetti L, Schmitt S, et al. Duplications upstream and downstream of SHOX identified as novel causes of Leri-Weill dyschondrosteosis or idiopathic short stature. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(4):949-57.

Burg ML, Chai Y, Yao CA, Magee W 3rd, Figueiredo JC. Epidemiology, etiology, and treatment of isolated cleft palate. *Front Physiol*. 2016;7:67.

Calì F, Failla P, Chiavetta V, Ragalmuto A, Ruggeri G, Schinocca P, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification detection of an unknown large deletion of the CREB-binding protein gene in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome. *Genet Mol Res*. 2013;12(3):2809-15.

Caliskan MO, Karauzum SB, Mihci E, Tacoy S, Luleci G. Subtelomeric chromosomal rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic features. *Genet Couns*. 2005;16(2):129-38.

Cammarata-Scalisi F, Avendaño A, Stock F, Callea M, Sparago A, Riccio A. Beckwith-Wiedemann syndrome: clinical and etiopathogenic aspects of a model genomic imprinting entity. *Arch Argent Pediatr*. 2018;116(5):368-373.

Carpenter NJ. Molecular cytogenetics. *Semin Pediatr Neurol*. 2001;8(3):135-46.

Casper J, Zweig AS, Villarreal C, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, et al. The UCSC Genome Browser database: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D762-D769.

Centre for Applied Genomics. Database of Genomic Variants - DGV. [database on the internet]. Toronto; [2016] [cited 2018 mar. 7]. Available from: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

Chen CP, Chang TY, Guo WY, Wu PC, Wang LK, Chern SR, et al. Chromosome 17p13.3 deletion syndrome: aCGH characterization, prenatal findings and diagnosis, and literature review. *Gene*. 2013;532(1):152-9.

Chen X, Li H, Mao Y, Xu X, Lv J, Zhou L, et al. Subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification as a supplement for rapid prenatal detection of fetal chromosomal aberrations. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):96.

Chen CP, Lin MH, Chen YY, Chern SR, Chen YN, Wu PS, et al. Prenatal diagnosis and array comparative genomic hybridization characterization of interstitial deletions of 8q23.3-q24.11 and 8q24.13 associated with Langer-Giedion syndrome, Cornelia de Lange syndrome and haploinsufficiency of TRPS1, RAD21 and EXT1. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2015;54(5):592-6.

Christofolini DM, Paula Ramos MA, Kulikowski LD, Silva Bellucco FT, Belangero SI, Brunoni D, et al. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. *J Intellect Disabil Res*. 2010;54(10):938-42.

Cody JD, Sebold C, Malik A, Heard P, Carter E, Crandall A, et al. Recurrent interstitial deletions of proximal 18q: a new syndrome involving expressive speech delay. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(11):1181-90.

Cody JD, Hasi M, Soileau B, Heard P, Carter E, Sebold C, et al. Establishing a reference group for distal 18q-: clinical description and molecular basis. *Hum Genet*. 2014;133(2):199-209.

- Cody JD, Sebold C, Heard P, Carter E, Soileau B, Hasi-Zogaj M, et al. Consequences of chromosome18q deletions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2015;169(3):265-80.
- Cohen MM Jr. Dysmorphic and genetic perspectives. In: Cohen MM Jr. *Perspective on the face*. Oxford: Oxford University; 2006. p.115-47.
- Conte F, Oti M, Dixon J, Carels CE, Rubini M, Zhou H. Systematic analysis of copy number variants of a large cohort of orofacial cleft patients identifies candidate genes for orofacial clefts. *Hum Genet*. 2016;135(1):41-59.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*. 2011;43(9):838-46.
- Correa FA, Jorge AA, Nakaguma M, Canton AP, Costa SS, Funari MF, et al. Pathogenic copy number variants in patients with congenital hypopituitarism associated with complex phenotypes. *Clin Endocrinol*. 2018;88(3):425-31.
- Crockett DJ, Goudy SL. Cleft lip and palate. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2014;22(4):573-86.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet*. 1998;79(1):42-7.
- Dagar V, Hutchison W, Muscat A, Krishnan A, Hoke D, Buckle, et al. Genetic variation affecting DNA methylation and the human imprinting disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):114.
- Dai J, Si J, Wang M, Huang L, Fang B, Shi J, et al. Tcof1-Related molecular networks in Treacher Collins syndrome. *J Craniofac Surg*. 2016;27(6):1420-6.
- Damnjanovic T, Cuturilo G, Maksimovic N, Dimitrijevic N, Mitic V, Jekic B., et al. Subtelomeric screening in Serbian children with dysmorphic features and unexplained developmental delay/intellectual disabilities. *Turk J Pediatr*. 2015;57(2):154-60.
- D'Annessa I, Cicconardi F, Di Marino D. Handling FMRP and its molecular partners: structural insights into fragile x syndrome. *Prog Biophys Mol Biol*. 2019;141:3-14.
- Darnell JC, Klann E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1530-6.
- Dave BJ, Sanger WG. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;14(1):2-6.
- Dawson G, Jones EJ, Merkle K, Venema K, Lowy R, Faja S, et al. Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012;51(11):1150-9.

Dawson G, Rogers S, Munson J, Smith M, Winter J, Greenson J, et al. Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the early start Denver model. *Pediatrics*. 2010;125(1):e17-23.

De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, et al. Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;15;44(4):268-74.

De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet*. 2007;44(12):750-62.

Depeyre A, Schlund M, Nicot R, Ferri J. Dental and maxillofacial signs in Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2019;77(4):762-8.

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

Dieker H, Edwards RH, ZuRhein G, Chou SM, Hartman HA, Opitz, JM. The lissencephaly syndrome. In: Bergsma D, editor. *The clinical delineation of birth defects: malformation syndromes*. New York: National Foundation-March of Dimes; 1969. v.2, p.53-64.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011;12(3):167-78.

Doray B, Badila-Timbolschi D, Schaefer E, Fattori D, Monga B, Dott B, et al. Épidémiologie des fentes labio-palatines: expérience du registre de malformations congénitales d'Alsace entre 1995 et 2006. *Arch Pediatr* 2012;19(10):1021-9.

Dostal A, Nemeckova J, Gaillyova R. The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009;37(5):272-5.

Dubourg C, Bonnet-Brilhault F, Toutain A, Mignot C, Jacquette A, Dieux A, et al. Identification of nine new RAI1-truncating mutations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions. *Mol Syndromol*. 2014;5(2):57-64.

Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1151:157-66.

Ensembl Project. [database on the internet]. Cambridgeshire; 2019. [update apr 2019; cited 2019 apr 20]. Available from: <http://www.ensembl.org/>

European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations. ECARUCA. [database on the internet]. Luxembourg: 2018. [update 2018; cited 2018 jun 20]. Available from: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/67405/reporting/en>

- Famiglietti ML, Estreicher A, Breuza L, Poux S, Redaschi N, Xenarios I, et al. An enhanced workflow for variant interpretation in UniProtKB/Swiss-Prot improves consistency and reuse in ClinVar.Database. 2019;2019:pii: baz040.
- Fatemi SH. Cerebellum and autism. *Cerebellum*. 2013;12(5):778-9.
- Fatemi SH, Kneeland RE, Liesch SB, Folsom TD. Fragile X mental retardation protein levels are decreased in major psychiatric disorders. *Schizophr Res*. 2010;124(1-3):246-7.
- Ferrero GB, Baldassarre G, Panza E, Valenzise M, Pippucci T, Mussa A, et al. A heritable cause of cleft lip and palate: Van der Woude syndrome caused by a novel IRF6 mutation: review of the literature and of the differential diagnosis. *Eur J Pediatr*. 2010;169(2):223-8.
- Fijałkowska M, Antoszewski B. Rare facial clefts. *Pol PrzeglChir* 2015;87(8):389-94.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet*. 2009;84(4):524-33.
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, et al. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*. 1997;6(8):1305-14.
- Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Busck: Copenhagen; 1942.
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006;16(8):949-61.
- Freitas JA, Neves LT, Almeida AL, Garib DG, Trindade-Suedam IK, Yaedú RY, et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP) - Part 1: overall aspects. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(1):9-15.
- Frumkin T, Peleg S, Gold V, Reches A, Asaf S, Azem F, et al. Complex chromosomal rearrangement-a lesson learned from PGS.J Assist Reprod Genet. 2017;34(8):1095-1100.
- Fukami M, Naiki Y, Muroya K, Hamajima T, Soneda S, Horikawa R, et al. Rare pseudoautosomal copy-number variations involving SHOX and/or its flanking regions in individuals with and without short stature. *J Hum Genet*. 2015;60(9):553-6.
- Gahunia HK, Babyn PS, Kirsch S, Mendoza-Londono R. Imaging of SHOX-associated anomalies. *SeminMusculoskeletRadiol*. 2009;13(3):236-54.
- Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, et al. Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex

rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(2):139-49.

Gallego MS, Zelaya G, Feliu AS, Rossetti L, Shaffer LG, Bailey KA, et al. ATR-16 due to a de novo complex rearrangement of chromosome 16. Hemoglobin. 2005;29(2):141-50.

Gatinois V, Puechberty J, Lefort G, Geneviève D, Pellestor F. Les remaniements chromosomiques complexes: un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique. *Med Sci.* 2014;30(1):55-63.

Giampietro PF, Haas BR, Lipper E, Gutman A, Zellers NJ, LaTrenta GS, et al. Fragile X syndrome in two siblings with major congenital malformations. *Am J Med Genet.* 1996;63(2):396-400.

Gibson WT, Harvard C, Qiao Y, Somerville MJ, Lewis ME, Rajcan-Separovic E. Phenotype-genotype characterization of alpha-thalassemia mental retardation syndrome due to isolated monosomy of 16p13.3. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(2):225-32.

Giedion A. Cone-shaped epiphyses of the hands and their diagnostic value. The tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Ann Radiol.* 1967;10(3):322-9.

Gorlin RJ, Cohen MM Junior, Hennekam JE. Syndromes of the head and neck. 4th ed. Oxford: Oxford University; 2001.

Gouas L, Kémény S, Beaufrère AM, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Tchirkov A, et al. Prenatal screening of 21 microdeletion/microduplication syndromes and subtelomeric imbalances by MLPA in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146(1):28-32.

Goumy C, Mihaescu M, Tchirkov A, Giollant M, Benier C, Francannet C, et al. De novo balanced complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosome 8, 11 and 16 in a boy with mild developmental delay and psychotic disorder. *Genet Couns.* 2006;17(3):371-9.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. Frontonasal dysplasia, macroblepharon, eyelid colobomas, ear anomalies, macrostomia, mental retardation and CNS structural anomalies: defining the phenotype. *Clin Dysmorphol.* 2001;10(2):81-6.

Gundlach KK, Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(Suppl 2):1-2.

Hagerman RJ, Hagerman PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(3):278-83.

Hagerman RJ, Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome — features, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(7):403-12.
Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, et al. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics.* 2009;123(1):378-90.

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, Bailey DB Jr, Moine H, Kooy RF, Tassone F, et al. Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17065.

Harteveld CL, Kriek M, Bijlsma EK, Erjavec Z, Balak D, Phylipsen M, et al. Refinement of the genetic cause of ATR-16. *Hum Genet*. 2007;122(3/4):283-92.

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet*. 2003;64(4):310-6.

Helali N, lafolla AK, Kahler SG, Qumsiyeh MB. A case of duplication of 13q32-->qter and deletion of 18p11.32-->pter with mild phenotype: Patau syndrome and duplications of 13q revisited. *J Med Genet*. 1996;33(7):600-2.

Hennekam RCM, Krantz ID, Allanason JE. Orofacial clefting syndrome: general aspects. In: Hennekam RCM, Krantz ID, Allanason JE. *Gorlin's syndromes of the head and neck*. 5th ed. Oxford: Oxford University; 2010. p.53-64.

Hing AV, Mefford HC, Cunningham ML. New developments in genetic diagnosis: implications for the craniofacial surgeon. *J Craniofac Surg*. 2012;23(1):212-6.

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

Hoyos LR, Thakur M. Fragile X premutation in women: recognizing the health challenges beyond primary ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(3):315-23.

Hubbard T, Barker D, Birney E, Cameron G, Chen Y, Clark L, et al. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):38-41.

Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, Parton A, et al. Ensembl variation resources. *Database (Oxford)*. 2018;2018.

Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(7):1648-58.

Imataka G, Ohwada Y, Shimura N, Yoshihara S, Arisaka O. Del(18)(q12.2q21.1) syndrome: a case report and clinical review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(17):3241-5.

International Standards for Cytogenomic Arrays. ISCA: big data mining in medicine. [database on the internet]. Bethesda: 2018. [update 2018; cited 2018 Jun 20]. Available from: <http://www.iscaconsortium.org>
Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*. 2012;74(2):285-99.

IPDTC Working Group. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J*. 2011;48(1):66-81.

Janchevska A, Tasic V, Laban N, Polenakovic M, Gucev Z, Bachmann N, et al. A 4-Year-Old Boy with Beckwith Wiedemann Syndrome (BWS). *Pril (MakedonAkadNaukUmet Odd Med Nauki)*. 2018;39(2-3):131-135.

Jehee FS, Johnson D, Alonso LG, Cavalcanti DP, Sá Moreira E, Alberto FL, et al. Molecular screening for microdeletions at 9p22-p24 and 11q23-q24 in a large cohort of patients with trigonocephaly. *Clin Genet*. 2005;67(6):503-10.

Jehee FS, Krepschi-Santos AC, Rocha KM, Cavalcanti DP, Kim CA, Bertola DR, et al. High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array-based comparative genome hybridisation. *J Med Genet*. 2008;45(7):447-50.

Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L, et al. Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? *Am J Med Genet A*. 2009 ;149A(6):1319-22.

Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet*. 2011;54(4):e425-32.

Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*. 2006;235(5):1152–66.

Johns Hopkins University.#192430: Velocardiofacial syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 1995a. [update 2010; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/192430>

Johns Hopkins University.#194190: Wolf-Hirschhorn syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 1995b. [update 2010; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/194190>

Johns Hopkins University. *300305: Sperm protein associated with the nucleus, x chromosome, family member a1; SPANXA1. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2007a. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/300305>

Johns Hopkins University. *300330: SPANX family, member C; SPANXC. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the

internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2007b. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/300330>

Johns Hopkins University. *300670: SPANX family, member D; SPANXD. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2007c. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/300670>

Johns Hopkins University. #611936: Chromosome 3q29 duplication syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2011. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://omim.org/entry/611936>

Johns Hopkins University. #608363: Chromosome 22q11.2 duplication syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2012a. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/608363>

Johns Hopkins University. #609425: Chromosome 3q29 deletion syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2012b. [update 2019 Feb; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/609425>

Johns Hopkins University. *300493: Sperm protein associated with the nucleus, X chromosome, family member A2; SPANXA2. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2014. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/300493>

Johns Hopkins University. #608572: Burn-mckeown syndrome; BMKS. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2015. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/608572>

Johns Hopkins University. #127300Leri-Weill dyschondrosteosis; LWD. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2016a. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/127300>

Johns Hopkins University. #141750: Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome, chromosome 16-related. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2016b. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/141750>

Johns Hopkins University. #249700: Langer mesomelic dysplasia; LMD. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the

internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2016c. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/249700>

Johns Hopkins University. #611913: Chromosome 16p11.2 deletion syndrome, 593-KB. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2016d. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/611913>

Johns Hopkins University. #612474: Chromosome 1q21.1 deletion syndrome, 1.35-MB. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2017a. [update 2019 Feb; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/612474>

Johns Hopkins University. #612475: Chromosome 1q21.1 duplication syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2017b. [update 2019 Feb; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://omim.org/entry/612475>

Johns Hopkins University. *312865 short stature homeobox; SHOX. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2018a. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/312865>

Johns Hopkins University. #601808: Chromosome 18q deletion syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2018b. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/601808>

Johns Hopkins University. #612001: Chromosome 15q13.3 deletion syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2018c. [update 2019; cited 2018 ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/612001>

Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2019a. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/>

Johns Hopkins University. #188400: Digeeorge syndrome; DGS. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2019b. [update 2019; cited 2018 Ago 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/188400>

Jønch AE, Larsen LG, Pouplier S, Nielsen K, Brøndum-Nielsen K, Tümer Z. Partial duplication of 13q31.3-q34 and deletion of 13q34 associated with diaphragmatic hernia as a sole malformation in a fetus. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(9):2302-8.

Jones MC. Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J*. 1988;25(1):16-20.

Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet.* 2001;109(4):440-51.

Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(3): 270-8.

Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009;15(7):437-53.

Jurkiewicz D, Kugaud M, Skórka A, Śmigielski, Smyk M, Ciara E, et al. A novel IGF2/H19 domain triplication in the 11p15.5 imprinting region causing either Beckwith-Wiedemann or Silver-Russell syndrome in a single family. *Am J Med Genet A.* 2017;173(1):72-78.

Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 2011;13(9):777-84.

Kariminejad A, Kariminejad R, Tzschach A, Ullmann R, Ahmed A, Asghari-Roodsari A, et al. Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: association of extra copy of MSX2 with craniosynostosis. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(7):1544-9.

Kaufmann WE, Kidd SA, Andrews HF, Budimirovic DB, Esler A, Haas-Givler B, et al. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: cooccurring conditions and current treatment. *Pediatrics.* 2017;139(Suppl 3):S194-S206.

Kenneson A, Warren ST. The female and the fragile X reviewed. *Semin Reprod Med.* 2001;19(2):159-65.

Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet.* 2001;10(14):1449-54.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.

Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A.* 2005;139(3):231-3.

Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, et al. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn.* 2010;30(10):995-9.

- Koga H, Iida K, Maeda T, Takahashi M, Fukushima N, Goshi T. Epidemiologic research on malformations associated with cleft lip and cleft palate in Japan. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149773.
- Köhler S, Vasilevsky NA, Engelstad M, Foster E, McMurry J, Aymé S, et al. The human phenotype ontology in 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D865-D876.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*. 2004;41(12):892-9.
- Kouprina N, Mullokandov M, Rogozin IB, Collins NK, Solomon G, Otstot J, et al. The SPANX gene family of cancer/testis-specific antigens: rapid evolution and amplification in African great apes and hominids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(9):3077-82.
- Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011;121(7/8):636-46.
- Kurnaz E, Savaş-Erdeve Ş, Çetinkaya S, Aycan Z. SHOX gene deletion screening by FISH in children with short stature and Madelung deformity and their characteristics. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;31(11):1273-8.
- Lachiewicz AM, Hoegerman SF, Holmgren G, Holmberg E, Arinbjarnarson K. Association of the Robin sequence with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1991;41(3):275-8.
- Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem*. 2006;39(3):196-202.
- Langer LO Jr. Dyschondrosteosis, a hereditary bone dysplasia with characteristic roentgenographic features. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1965;95:178-88.
- Ledbetter DH, Martin CL. Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(4):327-34.
- Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e8.
- Leri, A., Weill, J. Une affection congénitale et symétrique du développement osseux: la dyschondrosteose. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 1929;53:1491-4.
- Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C(4):246-58.

- Leslie EJ, O'Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, et al. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of popliteal pterygium disorders. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(3):545-52.
- Lindor NM, Valdes MG, Wick M, Thibodeau SN, Jalal S. De novo 16p deletion: ATR-16 syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;72(4):451-4.
- Loesch DZ, Hay DA, Sheffield LJ. Fragile X family with unusual digital and facial abnormalities, cleft lip and palate, and epilepsy. *Am J Med Genet*. 1992;44(5):543-50.
- Luijsterburg AJM, Vermeij-Keers C. Recording and classification common oral clefts. In: Lilja J. Transactions the 9th International Congress on cleft palate and related craniofacial anomalies; 2001 June 21-25; Göteborg. Sweden: Elanders Novum; 2001. p. 243-50.
- Luijsterburg AJM, Vermeij-Keers C. Ten years recording common oral clefts with a new descriptive system. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011;48(2):173-82.
- Maarse W, Rozendaal AM, Pajkrt E, Vermeij-Keers C, Mink van der Molen AB, van den Boogaard MJ. A systematic review of associated structural and chromosomal defects in oral clefts: when is prenatal genetic analysis indicated? *J Med Genet*. 2012;49(8):490-8.
- MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):D986-92.
- McDonald-McGinn DM. 22q11.2 deletion syndrome: A tiny piece leading to a big picture. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2055-7.
- McDonald-McGinn, D.M. Sullivan, K.E. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine*. 2011;90(1):1-18.
- McDonald-McGinn DM, Fahiminiya S, Revil T, Nowakowska BA, Suhl J, Bailey A, et al. Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. *J Med Genet*. 2013;50(2):80-90.
- Männik K, Mägi R, Macé A, Cole B, Guyatt AL, Shihab HA, et al. Copy number variations and cognitive phenotypes in unselected populations. *JAMA*. 2015;313(20):2044-54.
- Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:263-83.
- Margarit E, Morales C, Rodríguez-Revenge L, Monné R, Badenas C, Soler A, et al. Familial 4.8 MB deletion on 18q23 associated with growth hormone insufficiency and phenotypic variability. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(3):611-6.

- Mazzola RF, Mazzola IC. Facial clefts and facial dysplasia: revisiting the classification. *J Craniofac Surg*. 2014;25(1):26-34.
- Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 2002;3(3):91-102.
- Milani D, Pezzani L, Tabano S, Miozzo M. Beckwith-Wiedemann and IMAGE syndromes: two very different diseases caused by mutations on the same gene. *Appl Clin Genet*. 2014;7:169-75.
- Millar DS, Kembell-Cook G, McVey JH, Tuddenham EG, Mumford AD, Attock GB, et al. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Hum Genet*. 2000;107(4):327-42.
- Miller JQ. Lissencephaly in 2 siblings. *Neurology*. 1963;13:841-50.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010; 86(5):749-64.
- Mlynarski EE, Xie M, Taylor D, Sheridan MB, Guo T, Racedo SE, et al. International chromosome 22q11.2 consortium: rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Genet*. 2016;135(3):273-85.
- Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med*. 2006;147(6):295-300.
- Monteiro RAC, Freitas ML, Vianna GS, Oliveira VT, Pietra RX, Ferreira LCA, et al. Major contribution of genomic copy number variation in syndromic congenital heart disease: the use of MLPA as the first genetic test. *Mol Syndromol*. 2017;8(5):227-35.
- Monzani A, Babu D, Mellone S, Genoni G, Fanelli A, Prodam F, et al. Co-occurrence of genomic imbalances on Xp22.1 in the SHOX region and 15q25.2 in a girl with short stature, precocious puberty, urogenital malformations and bone anomalies. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):5.
- Morris CA. Williams syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington; 2019.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009;374(9703):1773-85.
- MRC-Holland. SALSA MLPA P036-E1 Human Telomere-3 (CE-IVD). In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2019a. [update 2019a; cited 2019 Apr 8]. Available from: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_jWdp7NYd4Ag.PnDHq0.

MRC-Holland.SALSA MLPA P064-C2 Mental Retardation-1B probemix. In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2019b. [update 2019b; cited 2019 Apr 8]. Available from:http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_WVMj-x0nilc.PnDHq0.

MRC-Holland.SALSA MLPA probemix P250-B2 Di George (CE-IVD). In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2019. [update 2019c; cited 2019 Apr 8]. Available from:http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_lvVNEbTPKzQ.

National Center for Biotechnology Information. ClinVar. [database on the internet]. Bethesda; 2018a. [update 2018; cited 2018 Jun 20]. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

National Center for Biotechnology Information. NCBI. [database on the internet]. Bethesda; 2018b. [update 2018; cited 2018 Jun 20]. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, et al. New microdeletion and microduplication syndromes: a comprehensive review. *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 Suppl):210-9.

Nevado J, Rosenfeld JA, Mena R, Palomares-Bralo M, Vallespín E, Ángeles Mori M, et al. PIAS4 is associated with macro/microcephaly in the novel interstitial 19p13.3 microdeletion/microduplication syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(12):1615-26.

Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M. Epidemiology of SHOX deficiency. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(6 Suppl):7-10.

Nolin SL, Glicksman A, Ding X, Ersalesi N, Brown WT, Sherman SL, et al. Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010. *Prenat Diagn*. 2011;31(10):925-31.

Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, et al. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45–69 repeat alleles. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(4):771-8.

Northrop EL, Ren H, Bruno DL, McGhie JD, Coffa J, Schouten J, et al. Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Hum Mutat*. 2005;26(5):477-86.

O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5158-62.

- Paaske EB, Garne E. Epidemiology of orofacial clefts in a Danish county over 35 years: before and after implementation of a prenatal screening programme for congenital anomalies. *Eur J Med Genet*. 2018;61(9):489-92.
- Palmer LD, Butcher NJ, Boot E, Hodgkinson KA, Heung T, Chow EWC, et al. Elucidating the diagnostic odyssey of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176(4):936-44.
- Panamonta V, Wichajarn K, Wongswadiwat Y, Panamonta M, Pradubwong S, Chowchuen B. Assessment of chromosome 22q11.2 deletion in patients with isolated cleft palate: a systematic review of prospective studies. *J Med Assoc Thai*. 2016;99(Suppl 5):S194-8.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update*. 2011;17(4):476-94.
- Phelan MC, Rogers RC, Stevenson RE: A de novo terminal deletion of 22q. *Am J Hum Genet A* 1988;43(Suppl.):A118.
- Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2013;6(1):7.
- Rappold GA, Durand C, Decker E, Marchini A, Schneider KU. New roles of SHOX as regulator of target genes. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012;9(Suppl 2):733-8.
- Ray P, Singh A, Dash JK, Sahoo PK, Dash JK. Fragile X syndrome: a rare case report with unusual oral features. *Contemp Clin Dent*. 2017;8(4):650-2.
- Renkema RW, Caron CJJM, Wolvius EB, Dunaway DJ, Forrest CR, Padwa BL, et al. Central nervous system anomalies in craniofacial microsomia: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(1):27-34.
- Riccardi F, Rivolta GF, Uliana V, Grati FR, La Starza R, Marcato L, et al. Cryptic 13q34 and 4q35.2 deletions in an Italian family. *Cytogenet Genome Res*. 2015;147(1):24-30.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
- Riethman H. Human subtelomeric copy number variations. *Cytogenet Genome Res*. 2009;123(1/4): 244-52.
- Rodrigues RM. Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido [dissertação]. Bauru (SP): Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo; 2010.

- Rodríguez-López R, Reyes-Palomares A, Sánchez-Jiménez F, Medina MÁ. PhenUMA: a tool for integrating the biomedical relationships among genes and diseases. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:375.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*. 2005;25(6):513-24.
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat*. 2004;23(1):17-21.
- Roos L, Brøndum Nielsen K, Tümer Z. A duplication encompassing the SHOX gene and the downstream evolutionarily conserved sequences. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(12):2900-1.
- Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, et al. Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet*. 2000;66(2):419-27.
- Rubinstein JH, Taybi H. Broad thumbs and toes and facial abnormalities: a possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child*. 1963;105:588-608.
- Rudd MK. Structural variation in subtelomeres. *Methods Mol Biol*. 2012;838:137-49.
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(11):4913-7.
- Saleh M, Kamath BM, Chitayat D. Alagille syndrome: clinical perspectives. *Appl Clin Genet*. 2016;9:75-82.
- Salinas-Torres VM, Salinas-Torres RA, Cerda-Flores RM, Gallardo-Blanco HL, Martínez-de-Villarreal LE. A clinical-pathogenetic approach on associated anomalies and chromosomal defects supports novel candidate critical regions and genes for gastroschisis. *Pediatr Surg Int*. 2018;34(9):931-943.
- Sandri RMCS. Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato [dissertação]. Bauru (SP): Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2011.
- Sanger Institute Genome Research. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. [database on the internet]. England; 2018. [update 2018; cited 2018 jun 20]. Available from: <https://decipher.sanger.ac.uk/>
- Santa María L, Faundes V, Curotto B, Morales P, Morales K, Aliaga S, et al. Comparison of two subtelomeric assays for the screening of chromosomal rearrangements: analysis of 383 patients, literature review and further recommendations. *J Appl Genet*. 2016;57(1):63-9.

- Saul RA, Tarleton JC. FMR1-related disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington; 2019.
- Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing de DiGeorge locus. *Lancet*. 1992;339(8802):1138-9.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2011;12:25-51.
- Schluth-Bolard C, Diguët F, Chatron N, Rollat-Farnier PA, Bardel C, Afenjar A, et al. Whole genome paired-end sequencing elucidates functional and phenotypic consequences of balanced chromosomal rearrangement in patients with developmental disorders. *J Med Genet*. 2019;pii:jmedgenet-2018-105778.
- 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(12):e57.
- Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1853-9.
- Seo GH, Kang E, Cho JH, Lee BH, Choi JH, Kim GH, et al. Turner syndrome presented with tall stature due to overdosage of the SHOX gene. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;20(2):110-3.
- Seo GH, Kim JH, Cho JH, Kim GH, Seo EJ, Lee BH, et al. Identification of 1p36 deletion syndrome in patients with facial dysmorphism and developmental delay. *Korean J Pediatr*. 2016;59(1):16-23.
- Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*. 2000;34:297-329.
- Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, et al. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(17):2242-51.
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, et al. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*. 1997;61(3):642-50.
- Shearer BM, Thorland EC, Gonzales PR, Ketterling RP. Evaluation of a commercially available focused aCGH platform for the detection of constitutional chromosome anomalies. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(20):2357-70.
- Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med*. 2005;7(8):584-7.

- Shterenshis M, Roitblat Y, Ilani J, Lumbroso J, Padilla-Raygoza N. The 11p15.5 chromosomal region: When did the instability occur? *Med Hypotheses*. 2018 Dec;121:21-25.
- Shterenshis M, Roitblat Y, Rosenberg S, Singer M, Lumbroso J. Hemihyperplasia: History of medicine assists medical genetics. *Homo*. 2018 (a) Sep;69(5):227-236.
- Shi M, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. Genome wide study of maternal and parent-of-origin effects on the etiology of orofacial clefts. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(4):784-94.
- Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008;13(17/18):760-70.
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Young D, Wolford L. The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics*. 1981;67(2):167-72.
- Shprintzen RJ, Siegel-Sadewitz VL, Amato J, Goldberg RB. Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. *Am J Med Genet*. 1985;20(4):585-95.
- Silva OG Filho, Freitas JAS. Caracterização morfológica e origem embriológica. In: Trindade IEK, Silva OG Filho, coordenadores. *Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar*. São Paulo: Editora Santos; 2007. p.17-49.
- Smith AC, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonona J, et al. Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet*. 1986;24(3):393-414.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*. 2004;13(spec n. 1):r73-81.
- Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis, *CurrProtoc Bioinformatics*. 2016;54:1.30.1-1.30.33.
- Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet*. 2008;51(2):93-105.
- Swaminathan GJ, Bragin E, Chatzimichali EA, Corpas M, Bevan AP, Wright CF, et al. DECIPHER: web-based, community resource for clinical interpretation of rare variants in developmental disorders. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):R37-44.
- Szczałuba K, Jakubiuk-Tomaszuk A, Kędzior M, Bernaciak J, Zdrodowska J, Kurzątkowski W, et al. Cytogenomic evaluation of children with congenital anomalies: critical implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Adv Exp Med Biol*. 2016;912:11-9.

Tassone F, Hall DA. FXTAS FXPOI and other premutation disorders. Switzerland: Springer International; 2016.

Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, Martínez-Glez V, Romanelli V, Arias P, et al. A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125. *Hum Mutat*. 2014;35(12):1436-41.

Tessier P. Anatomical classification facial, cranio-facial and latero-facial clefts. *J Maxillofac Surg*. 1976;4(2):69–92.

Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigelioniene G, Bruno DL, et al. Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(7):1407-14.

Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*. 1998;75(2):126–37.

Torrioli M, Vernacotola S, Setini C, Bevilacqua F, Martinelli D, Snape M, et al. Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(6):1420-7.

Tos T, Karaman A, Aksoy A, Tukun A. Structural chromosomal abnormalities in patients with mental retardation and/or multiple congenital anomalies: a new series of 24 patients. *Genet Couns*. 2012;23(2):289-96.

Tropeano M, Howley D, Gazzellone MJ, Wilson CE, Ahn JW, Stavropoulos DJ, et al. Microduplications at the pseudoautosomal SHOX locus in autism spectrum disorders and related neurodevelopmental conditions. *J Med Genet*. 2016;53(8):536-47.

Twigg SR, Wilkie AO. New insights into craniofacial malformations. *Hum Mol Genet*. 2015;24(R1):R50-9.

University of California Santa Cruz. UCSC Genome Browser. [database on the internet]. California; 2018. [update 2018; cited 2018 Jun 20]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/>

Utari A, Adams E, Berry-Kravis E, Chavez A, Scaggs F, Ngotran L, et al. Aging in fragile X syndrome. *J NeurodevDisord*. 2010;2(2):70-6

Utin GE, Haliloğlu G, Volkan-Salancı B, Çetinkaya A, Kiper PÖ, Alanay Y, et al. Etiological yield of SNP microarrays in idiopathic intellectual disability. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014;18(3):327-37.

Valetto A, Bertini V, Michelucci A, Toschi B, Dati E, Baroncelli GI, et al. Short stature in isodicentric y chromosome and three copies of the SHOX gene: clinical report and review of literature. *Mol Syndromol*. 2016;7(1):19-25.

Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *CleftPalate J*. 1987;24(3):216–25.

- Verdú Pérez A, García Murillo PL, García Campos O, López Grondona F, Arriola Pereda G, AlcarazRousselet MA, et al. Anomalias cromosómicas subteloméricas en pacientes con retraso mental criptogénico. *An Pediatr*. 2011;75(6):365-71.
- Vieira TP, Monteiro FP, Sgardioli IC, Souza J, Fett-Conte AC, Monlleó IL, et al. Clinical features in patients with 22q11.2 deletion syndrome ascertained by palatal abnormalities. *Cleft Palate Craniofac J*. 2015;52(4):411-6.
- Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol*. 2012;838:29-75.
- Vo OK, McNeill A, Vogt KS. The psychosocial impact of 22q11 deletion syndrome on patients and families: a systematic review. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2215-25.
- Wang C, Ren H, Dong H, Liang M, Wu Q, Liao Y. 18q22.1-qter deletion and 4p16.3 microduplication in a boy with speech delay and mental retardation: case report and review of the literature. *Mol Cytogenet*. 2018;11:55.
- Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP, Aylsworth AS. Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clin Plast Surg* 2014;41(2):149-63.
- Weckselblatt B, Rudd MK. Human structural variation: mechanisms of chromosome rearrangements. *Trends Genet*. 2015;31(10):587-99.
- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, et al. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(5):346-58.
- Westbrook VA, Diekman AB, Klotz KL, Khole VV, von Kap-Herr C, Golden WL, et al. Spermatid-specific expression of the novel X-linked gene product SPAN-X localized to the nucleus of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2000;63(2):469-81.
- White JC, Liu J, Nahar A. Simultaneous Presentation of Wilms Tumor and Immature Ovarian Teratoma in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018;40(1):e61-e63.
- Wichajarn K, Panamonta O, Pradubwong S, Panamonta M, Weraarchakul W, Chowchuen B. Prevalence and type of associated syndromes in patients with cleft lip and cleft palate who received the treatment in Tawanchai Center until 4-5 years of age. *J Med Assoc Thai*. 2014;97 (Suppl 10):S105-9.
- Wieczorek D, Newman WG, Wieland T, Berulava T, Kaffe M, Falkenstein D, et al. Compound heterozygosity of low-frequency promoter deletions and rare loss-of-function mutations in TXNL4A causes Burn-McKeown syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014;95(6):698-707.

- Williams CL, Nelson KR, Grant JH, Mikhail FM, Robin NH. Cleft palate in a patient with the nested 22q11.2 LCR C to D deletion. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(1):260-2.
- Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*. 1961;24:1311-8.
- Wirojatanan J, Jacquemont S, Diaz R, Bacalman S, Anders TF, Hagerman RJ, et al. The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism, fragile X syndrome, or autism and fragile X syndrome. *J Clin Sleep Med*. 2009;5(2):145-50.
- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, et al. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet*. 2007;80(1):91-104.
- Xavier GM, Seppala M, Barrell W, Birjandi AA, Geoghegan F, Cobourne MT. Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Dev Biol*. 2016;415(2):198-215.
- Xu Q, Goldstein J, Wang P, Gadi IK, Labreche H, Rehder C, et al. Chromosomal microarray analysis in clinical evaluation of neurodevelopmental disorders-reporting a novel deletion of SETDB1 and illustration of counseling challenge. *Pediatr Res*. 2016;80(3):371-81.
- Xu F, Li L, Schulz VP, Gallagher PG, Xiang B, Zhao H, et al. Cytogenomic mapping and bioinformatic mining reveal interacting brain expressed genes for intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):4.
- Yamada T, Sugiyama G, Higashimoto K, Nakashima A, Nakano H, Sumida T, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome with asymmetric mosaic of paternal disomy causing hemihyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019;127(3):e84-e88.
- Yatsenko SA, Brundage EK, Roney EK, Cheung SW, Chinault AC, Lupski JR. Molecular mechanisms for subtelomeric rearrangements associated with the 9q34.3 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2009;18(11):1924-36.
- Yatsenko SA, Hixson P, Roney EK, Scott DA, Schaaf CP, Ng YT, et al. Human subtelomeric copy number gains suggest a DNA replication mechanism for formation: beyond breakage-fusion-bridge for telomere stabilization. *Hum Genet*. 2012;131(12):1895-910.
- Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med*. 2012;14(8):729-36.
- Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *J NeurodevDisord*. 2014;6(1):24.
- Zanardo EA. Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor

[dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.

Zendman AJ, Zschocke J, van Kraats AA, de Wit NJ, Kurpisz M, Weidle UH, et al. The human SPANX multigene family: genomic organization, alignment and expression in male germ cells and tumor cell lines. *Gene.* 2003;309(2):125-33.

APÊNDICES

APÊNDICE A– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Participante da Pesquisa ou Responsável

DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: RG HRAC:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
CIDADE: ESTADO:
TELEFONE: (.....) CELULAR: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
CIDADE: ESTADO:
TELEFONE: (.....) CELULAR: (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA

“Microarranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rosana Maria Candido de Souza Sandri

Bióloga, pós-graduanda em Ciências da Reabilitação do HRAC/USP.

ORIENTADOR: Antonio Richieri da Costa

Médico Geneticista da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular da Divisão de Sindromologia do HRAC-USP.

Esclarecimentos

O(A) seu(sua) filho(a) está sendo convidado(a) participar da pesquisa “Microarranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”, realizada pela bióloga Rosana Maria Candido de Souza Sandri (CRbio nº. 31679/01-D) sob a orientação do Dr. Antonio Richieri da Costa (CRM nº. 17.164) e coorientação da Dr^a. Roseli Maria Zechi Ceide (CRbio nº. 18896/01-D) e que segue as recomendações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares.

Sua participação é opcional, ou seja, você pode se recusar a participar deste estudo a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Antes de concordar em participar é importante que você entenda todas as informações relativas a este estudo de pesquisa. Portanto, peça explicações sobre quaisquer palavras deste documento que você não compreenda e, antes de assinar, certifique-se de que tudo foi respondido conforme suas dúvidas.

Essa pesquisa que tem como objetivos identificar pequenas alterações nos cromossomos de indivíduos com alterações no crânio e na face. Essas pequenas alterações não podem ser vistas no cariótipo que você ou seu filho já realizou e para identificá-las vamos usar uma técnica mais avançada chamada MLPA. Para a realização dessa técnica é utilizado uma pequena quantidade de DNA tirado de uma amostra de sangue (3 ml) que será analisado no laboratório.

Caso decida aceitar o convite, será realizada uma anamnese que incluirá dados de identificação, gestação, desenvolvimento e saúde, os quais serão obtidos diretamente de você e/ou de seus familiares. Em seguida, será coletada uma amostra de sangue (do participante e dos seus familiares presentes) para Extração de DNA: 3ml (para aqueles que não tiverem seu DNA armazenado no Laboratório de Genética Clínica e Biologia Molecular do HRAC/USP).

Riscos

Os procedimentos a serem realizados possuem risco mínimo para o participante. Em relação à coleta de sangue para a realização de do cariótipo e para a extração de DNA, este procedimento poderá causar desconforto e, nesse processo, poderá ocorrer o aparecimento de uma mancha arroxada (hematoma) no local onde o sangue foi retirado. Caso você se sinta, em qualquer momento, desconfortável durante esse procedimento, você poderá pedir para que a coleta seja interrompida.

Benefícios

O participante deste estudo será beneficiado quanto ao acesso ao aconselhamento genético e condutas terapêuticas adequadas. Esta pesquisa poderá ampliar o conhecimento científico sobre as causas das fissuras orofaciais, sobre as síndromes conhecidas, a possibilidade de novos diagnósticos e, ainda, as chances de identificação de síndromes novas.

Sigilo e privacidade

Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo e seu nome não será identificado em nenhuma fase/etapa desta pesquisa. Caso os dados obtidos neste estudo venham a ser utilizados para publicação científica ou atividades didáticas, não serão mencionados nomes que possam vir a identificá-lo. Você ficará com uma via deste Termo, que deverá ser rubricada e assinada em

Rubricas:

Participante da pesquisa:

Pesquisador Responsável:

cada página e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, em qualquer momento do estudo, você poderá perguntar diretamente para Rosana Maria Candido de Souza Sandri, pelo telefone (14) 3235-8022 ou no endereço Rua Silvio Marchioni, 3-20, Vila Universitária, Bauru-SP, CEP: 17012-900. Se tiver alguma dúvida ou consideração a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP, no endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20, Vila Universitária, Bauru-SP, CEP 17012-900, telefone (14) 3235-8421, horário de atendimento: 8 às 18h de segunda à sexta (exceto feriados).

Despesas e compensações

Não há despesas pessoais, ou seja, não será cobrado nada de você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, uma vez que serão realizadas no momento da vinda ao Hospital para os agendamentos previstos na rotina de atendimentos. Também não há compensação financeira ou qualquer tipo de pagamento relacionado à sua participação.

Indenizações

Caso lhe sobrevenha eventuais danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, você terá o direito à indenização, segundo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Em qualquer momento do estudo, você poderá solicitar sua retirada do protocolo de pesquisa sem que isso apresente qualquer consequência para o tratamento de rotina no HRAC-USP. Para tanto, pedimos, somente, que seja comunicado o desligamento ao responsável pela pesquisa.

Declaro ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“Microrrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”**

Eu conversei com o responsável pela pesquisa, sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido, seus desconfortos e riscos, os benefícios, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro, também, que a minha participação é isenta despesas, logo, não serei ressarcido, e, caso sofra algum dano, terei direito a ser indenizado. Concordo, voluntariamente, na minha participação e foram-me garantidos esclarecimentos que tenho o direito de desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, antes ou mesmo durante, sem que minha desistência cause qualquer prejuízo a minha pessoa ou a minha família. Autorizo, assim, a publicação dos dados desta pesquisa para fins científicos, em revistas e eventos especializados na área, incluindo o uso de imagens, sendo-me garantido o meu anonimato e o sigilo dos dados referentes à minha identificação.

Desejo ser informado sobre os resultados dos teste genéticos a que serei submetido, bem como ser esclarecido sobre seus significados (os resultados serão comunicados durante os retornos ambulatoriais de rotina):

1. SIM () 2. NÃO ()

Uso e destino do material biológico:

O material biológico coletado no estudo mencionado será utilizado somente para as finalidades descritas no protocolo. Após ter sido analisado os dados, o material biológico será:

1. () destruído/descartado
2. () devolvido ao paciente
3. () armazenado no Laboratório da SGCBM-HRAC-USP, sob a responsabilidade do Dr. Antonio Richieri da Costa, orientador desse projeto, para futuros estudos relacionados às causas das anomalias craniofaciais, sobre os quais:
a () eu quero ser previamente comunicado b () eu não quero ser previamente comunicado

Observação: No caso da opção 3: a) o material biológico (DNA) ficará armazenado no Laboratório da SGCBM-HRAC-USP por um prazo máximo de 10 anos, sob a responsabilidade do pesquisador principal por essa pesquisa e, após esse período, a amostra será descartada, conforme regulamentação do artigo 12 da Resolução CNS 441/2011; b) Em caso de pesquisa futura com o DNA armazenado, além do participante ser previamente comunicado, será encaminhado novo projeto ao CEP do HRAC.

Assinatura do participante

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

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

Por fim, como pesquisador responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 da resolução do CNS/MS nº 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Nome do Pesquisador Responsável: Rosana Maria Candido de Souza Sandri - E-mail: rosanasandri@usp.br

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-20 - Cidade: Bauru, SP. CEP: 17012-900 Telefone: (14) 3235-8022

APÊNDICE B– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Familiar

DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FAMILIARES

1. NOME: RG HRAC:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
CIDADE: ESTADO:
TELEFONE: (.....)..... CELULAR: (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
CIDADE: ESTADO:
TELEFONE: (.....)..... CELULA: (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA

“Microrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rosana Maria Candido de Souza Sandri

Bióloga, pós-graduada em Ciências da Reabilitação do HRAC/USP.

ORIENTADOR: Antonio Richieri da Costa

Médico Geneticista da Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular da Divisão de Sindromologia do HRAC-USP.

Esclarecimentos

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “Microarranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”, realizada pela bióloga Rosana Maria Candido de Souza Sandri (CRbio nº. 31679/01-D) sob a orientação do Dr. Antonio Richieri da Costa (CRM nº. 17.164) e coorientação da Drª. Roseli Maria Zechi Ceide (CRbio nº. 18896/01-D) e que segue as recomendações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares.

Sua participação é opcional, ou seja, você pode se recusar a participar deste estudo a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Antes de concordar em participar é importante que você entenda todas as informações relativas a este estudo de pesquisa. Portanto, peça explicações sobre quaisquer palavras deste documento que você não compreenda e, antes de assinar, certifique-se de que tudo foi respondido conforme suas dúvidas.

Essa pesquisa que tem como objetivos identificar pequenas alterações nos cromossomos de indivíduos com alterações no crânio e na face. Essas pequenas alterações não podem ser vistas no cariótipo que você ou seu filho já realizou e para identificá-las vamos usar uma técnica mais avançada chamada MLPA. Para a realização dessa técnica é utilizado uma pequena quantidade de DNA tirado de uma amostra de sangue (3 ml) que será analisado no laboratório.

Caso decida aceitar o convite, será realizada uma anamnese que incluirá dados de identificação, gestação, desenvolvimento e saúde, os quais serão obtidos diretamente de você e/ou de seus familiares. Em seguida, será coletada uma amostra de sangue (do participante e dos seus familiares presentes) para: extração de DNA: 3ml (para aqueles que não tiverem seu DNA armazenado no Laboratório de Genética Clínica e Biologia Molecular do HRAC/USP).

Riscos

Os procedimentos a serem realizados possuem risco mínimo para o participante. Em relação à coleta de sangue para a realização de do cariótipo e para a extração de DNA, este procedimento poderá causar desconforto e, nesse processo, poderá ocorrer o aparecimento de uma mancha arroxada (hematoma) no local onde o sangue foi retirado. Caso você se sinta, em qualquer momento, desconfortável durante esse procedimento, você poderá pedir para que a coleta seja interrompida.

Benefícios

O participante deste estudo será beneficiado quanto ao acesso ao aconselhamento genético e condutas terapêuticas adequadas. Esta pesquisa poderá ampliar o conhecimento científico sobre as causas das fissuras orofaciais, sobre as síndromes conhecidas, a possibilidade de novos diagnósticos e, ainda, as chances de identificação de síndromes novas.

Sigilo e privacidade

Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo e seu nome não será identificado em nenhuma fase/etapa desta pesquisa. Caso os dados obtidos neste estudo venham a ser utilizados para publicação científica ou atividades didáticas, não serão mencionados nomes que possam vir a identificá-lo. Você ficará com uma via deste Termo, que deverá ser rubricada e assinada em cada página e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, em qualquer momento do estudo, você poderá perguntar diretamente para Rosana Maria Candido de Souza Sandri, pelo telefone (14) 3235-8022 ou no endereço Rua Silvio Marchioni, 3-20.

Rubricas:

Participante da pesquisa: _____

Pesquisador Responsável: _____

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Vila Universitária, Bauru-SP, CEP: 17012-900. Se tiver alguma dúvida ou consideração a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP, no endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20, Vila Universitária, Bauru-SP, CEP 17012-900, telefone (14) 3235-8421, horário de atendimento: 8 às 18h de segunda à sexta (exceto feriados).

Despesas e compensações

Não há despesas pessoais, ou seja, não será cobrado nada de você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, uma vez que serão realizadas no momento da vinda ao Hospital para os agendamentos previstos na rotina de atendimentos. Também não há compensação financeira ou qualquer tipo de pagamento relacionado à sua participação.

Indenizações

Caso lhe sobrevenha eventuais danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, você terá o direito à indenização, segundo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Em qualquer momento do estudo, você poderá solicitar sua retirada do protocolo de pesquisa sem que isso apresente qualquer consequência para o tratamento de rotina no HRAC-USP. Para tanto, pedimos, somente, que seja comunicado o desligamento ao responsável pela pesquisa.

Declaro ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“Microrrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”**.

Eu conversei com o responsável pela pesquisa, sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido, seus desconfortos e riscos, os benefícios, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro, também, que a minha participação é isenta despesas, logo, não serei ressarcido, e, caso sofra algum dano, terei direito a ser indenizado. Concordo, voluntariamente, na minha participação e foram-me garantidos esclarecimentos que tenho o direito de desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, antes ou mesmo durante, sem que minha desistência cause qualquer prejuízo a minha pessoa ou a minha família. Autorizo, assim, a publicação dos dados desta pesquisa para fins científicos, em revistas e eventos especializados na área, incluindo o uso de imagens, sendo-me garantido o meu anonimato e o sigilo dos dados referentes à minha identificação.

Desejo ser informado sobre os resultados dos teste genéticos a que serei submetido, bem como ser esclarecido sobre seus significados (os resultados serão comunicados durante os retornos ambulatoriais de rotina):

1. SIM () 2. NÃO ()

Uso e destino do material biológico:

O material biológico coletado no estudo mencionado será utilizado somente para as finalidades descritas no protocolo. Após ter sido analisado os dados, o material biológico será:

1. () destruído/descartado
2. () devolvido ao paciente
3. () armazenado no Laboratório da SGCBM-HRAC-USP, sob a responsabilidade do Dr. Antonio Richieri da Costa, orientador desse projeto, para futuros estudos relacionados às causas das anomalias craniofaciais, sobre os quais:
a () eu quero ser previamente comunicado b () eu não quero ser previamente comunicado

Observação: No caso da opção 3: a) o material biológico (DNA) ficará armazenado no Laboratório da SGCBM-HRAC-USP por um prazo máximo de 10 anos, sob a responsabilidade do pesquisador principal por essa pesquisa e, após esse período, a amostra será descartada, conforme regulamentação do artigo 12 da Resolução CNS 441/2011; b) Em caso de pesquisa futura com o DNA armazenado, além do participante ser previamente comunicado, será encaminhado novo projeto ao CEP do HRAC.

Assinatura do participante

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

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

Por fim, como pesquisador responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 da resolução do CNS/MS nº 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Nome do Pesquisador Responsável: Rosana Maria Candido de Souza Sandri - E-mail: rosanasantdri@usp.br

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-20 - Cidade: Bauru, SP. CEP: 17012-900 Telefone: (14) 3235-8022

APÊNDICE C –Termo de Assentimento (até 12 anos)

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

TERMO DE ASSENTIMENTO
(para faixa etária até 12 anos)

Meu nome é Rosana Maria Candido de Souza Sandri e meu trabalho é pesquisar o porquê que as crianças nascem com alterações na cabeça, no rosto, na boca, nos olhos, nas orelhas, nas mãos, nos pés e em outras partes do corpo. Queremos saber a causa de isso acontecer, para prevenir que as crianças nasçam com estas alterações e pensamos que este estudo poderia nos ajudar. Nós estamos estudando as crianças que vêm para tratamento aqui no hospital, que apresentam alterações em diferentes partes do corpo. Por isso, estamos convidando você a participar desta pesquisa.

Você pode escolher se quer ou não participar

Conversamos sobre essa pesquisa com os seus pais/responsáveis e eles sabem que nós estamos pedindo a sua permissão. Se você escolher participar dessa pesquisa, seus pais/responsáveis também terão que concordar.

Mas se você não quiser participar, mesmo que os seus pais/responsáveis tenham concordado, você não é obrigado a participar. Assim, você não tem que participar dessa pesquisa se não quiser. Se você decidir não participar, nada muda o seu tratamento aqui no Hospital. E, mesmo que você diga "sim" agora, você pode mudar de ideia mais tarde.

Rubricas:

Participante da pesquisa: _____

Pesquisador Responsável: _____

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Vou te dar informações e convidar você a fazer parte da pesquisa. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você queira que eu explique mais. Por favor, pode me perguntar a qualquer momento, e eu vou explicar e tirar suas dúvidas.

Nesta pesquisa, nós queremos saber qual o tipo (nome) da doença que você tem e tentar descobrir o motivo das crianças nascerem com essas alterações. O resultado desta pesquisa irá nos dar maior conhecimento para orientarmos os seus pais/responsáveis tanto em relação às causas, quanto ao tratamento adequado para você.

Você pode conversar e discutir sobre qualquer coisa dessa ficha de informação com seus pais/responsáveis, amigos ou qualquer outra pessoa que você se sinta a vontade para falar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter falado sobre isso. Você não tem que decidir agora.

Rubricas:

Participante da pesquisa: _____

Pesquisador Responsável: _____

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Se você decidir que quer fazer isso, três coisas serão feitas:

1. Conversar com seus pais/responsáveis, onde serão feitas perguntas sobre a fase da gravidez, o seu nascimento e informações da sua família;

2. fotografias do seu rosto, mãos e pés;

3. coleta de sangue de você, dos seus pais e de outros familiares que estiverem presentes.

A coleta de sangue será feita através de uma pequena picada no braço, com auxílio de uma agulha pequena, para retirar uma pequena quantidade de sangue. Essa coleta poderá ocasionar um pouco de dor e, às vezes, formar uma pequena mancha roxa no local onde o sangue foi tirado. Caso isso ocorra, você será orientado sobre os cuidados necessários.

Com esta pesquisa, os seu pais/responsáveis poderão receber informações sobre o tratamento adequado para você e orientações sobre a possibilidade de eles terem outros filhos com a mesma doença genética. No futuro, você também poderá receber orientações sobre os seus filhos. Além disso, este estudo poderá nos ajudar a entender melhor as doenças genéticas e, assim, ajudar sua família e a família de outras crianças que também tiveram as mesmas alterações que você.

Rubricas:

Participante da pesquisa: _____

Pesquisador Responsável: _____

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

As informações sobre você serão obtidas durante a pesquisa e ninguém, exceto os pesquisadores, poderá ver estas informações. Não falaremos que você está fazendo parte dessa pesquisa com mais ninguém e seu nome não irá aparecer em nenhum lugar.

Depois que a pesquisa acabar, os resultados serão informados a você e aos seus pais/responsáveis. Estes resultados poderão, também ser publicados em uma revista, livro, congressos, etc..

É importante reforçar para você que a sua participação é voluntária. Ninguém ficará bravo ou desapontado com você, se você disser que não quiser participar. A escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois, se você quiser. Você pode dizer sim agora e mudar de ideia depois, e tudo continuará bem.

ASSENTIMENTO

Eu entendi que esta pesquisa é sobre o estudo das doenças e de suas causas que levam crianças a nascerem com alterações em várias partes do corpo e que eu vou dar um pouco de sangue com uma picada no braço.

Eu li esta informação (ou leram esta informação para mim) e tive minhas perguntas respondidas e sei que posso perguntar, depois, se eu tiver mais dúvidas.

() Eu aceito participar dessa pesquisa

() Eu não desejo participar dessa pesquisa

Somente se a criança/adolescente consentir:

Nome da criança/adolescente _____

Assinatura da criança/adolescente _____

Data: ____/____/____

Eu acompanhei a leitura das informações que foi feita à criança/adolescente sobre a pesquisa "Microarranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas" e o(a) meu(minha) filho(a) concordou em participar. Confirmando que ele(a) tenha dado seu consentimento, livremente.

Assinatura dos pais/responsáveis: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Data: ____/____/____

APÊNDICE D – Termo de Assentimento (13 a 18 anos)

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR

TERMO DE ASSENTIMENTO

(para faixa etária de 13 a 18 anos)

Meu nome é Rosana Maria Candido de Souza Sandri e este trabalho é para podermos pesquisar e descobrir o porquê que as crianças nascem com alterações na cabeça, no rosto, na boca, nos olhos, nas orelhas, nas mãos, nos pés e em outras partes do corpo. Queremos saber a causa de isso acontecer, para prevenir que as crianças nasçam com estas alterações. Para isso, nós pensamos que este estudo poderia nos ajudar.

Nós estamos estudando as crianças que vêm para tratamento aqui no hospital, que apresentam alterações em diferentes partes do corpo. Por isso, estamos convidando você a participar desta pesquisa. Você pode escolher se deseja ou não participar.

Vou te dar informações e convidar você a fazer parte da pesquisa. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você queira que eu explique mais. Por favor, pode me perguntar a qualquer momento, e eu vou explicar e tirar suas dúvidas.

Nesta pesquisa, nós queremos saber qual o tipo (nome) da doença que você tem e tentar descobrir o motivo das crianças nascerem com essas alterações. O resultado desta pesquisa irá nos dar maior conhecimento para orientarmos os seus pais/responsáveis tanto em relação às causas, quanto ao tratamento adequado para você.

Conversamos sobre essa pesquisa com os seus pais/responsáveis e eles sabem que nós estamos pedindo a sua permissão. Se você escolher participar dessa pesquisa, seus pais/responsáveis também terão que concordar. Mas se você não quiser participar, mesmo que os seus pais/responsáveis tenham concordado, você não é obrigado a participar. Assim, você não tem que participar dessa pesquisa se não quiser. Se você decidir não participar, nada muda o seu tratamento aqui no Hospital. E, mesmo que você diga “sim” agora, você pode mudar de ideia mais tarde.

Você pode conversar e discutir sobre qualquer coisa dessa ficha de informação com seus pais/responsáveis, amigos ou qualquer outra pessoa que você se sinta a vontade para falar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter falado sobre isso. Você não tem que decidir agora.

Se você decidir que quer fazer isso, três coisas serão feitas:

1. Conversar com seus pais/responsáveis, onde serão feitas perguntas sobre a fase da gravidez, o seu nascimento e informações da sua família;
2. fotografias do seu rosto, mãos e pés;
3. coleta de sangue de você, dos seus pais e de outros familiares que estiverem presentes.

A coleta de sangue será feita através de uma pequena picada no braço, com auxílio de uma agulha pequena, para retirar uma pequena quantidade de sangue. Essa coleta poderá ocasionar um pouco de dor e, às vezes, formar uma pequena mancha roxa no local onde o sangue foi tirado. Caso isso ocorra, você será orientado sobre os cuidados necessários.

Com esta pesquisa, os seu pais/responsáveis poderão receber informações sobre o tratamento adequado para você e orientações sobre a possibilidade de eles terem outros filhos com a mesma doença genética. No futuro, você também poderá receber orientações sobre os seus filhos. Além disso, este estudo poderá nos ajudar a entender melhor as doenças genéticas e, assim, ajudar sua família e a família de outras crianças que também tiveram as mesmas alterações que você.

Rubricas:

Participante da pesquisa: _____
Pesquisador Responsável: _____

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR

As informações sobre você serão obtidas durante a pesquisa e ninguém, exceto os pesquisadores, poderá ver estas informações. Não falaremos que você está fazendo parte dessa pesquisa com mais ninguém e seu nome não irá aparecer em nenhum lugar.

Depois que a pesquisa acabar, os resultados serão informados a você e aos seus pais/responsáveis. Estes resultados poderão, também, ser publicados em uma revista, livro, congressos, etc..

É importante reforçar para você que a sua participação é voluntária. Ninguém ficará bravo ou desapontado com você, se você disser que não quiser participar. A escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois, se você quiser. Você pode dizer sim agora e mudar de ideia depois, e tudo continuará bem.

ASSENTIMENTO

Eu entendi que esta pesquisa é sobre o estudo das doenças e de suas causas que levam crianças a nascerem com alterações em várias partes do corpo e que eu vou dar um pouco de sangue com uma picada no braço.

Eu li esta informação (ou leram esta informação para mim) e tive minhas perguntas respondidas e sei que posso perguntar, depois, se eu tiver mais dúvidas.

() Eu aceito participar dessa pesquisa

() Eu não desejo participar dessa pesquisa

Somente se a criança/adolescente consentir:

Nome da criança/adolescente _____

Assinatura da criança/adolescente _____

Data: ____/____/____

Eu acompanhei a leitura das informações que foi feita à criança/adolescente sobre a pesquisa **“Microarranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas”** e o(a) meu(minha) filho(a) concordou em participar. Confirmando que ele(a) tenha dado seu consentimento, livremente.

Assinatura dos pais/responsáveis: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Data: ____/____/____

APÊNDICE E – Termo de Permissão para uso de registros para fins científicos

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DIVISÃO DE SINDROMOLOGIA
SEÇÃO DE GENÉTICA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Termo de Permissão para uso de registros para fins científicos
(fotografias, radiografias, tomografias e respectivos laudos odontológicos e médicos, vídeo
imagens, amostra de voz/fala, registros clínicos, imagens de órgãos e espécimes para
pesquisa, fins didáticos e publicação de artigos científicos)

Eu, _____, brasileiro____, residente no
endereço _____, na
cidade de _____ - _____, RG nº _____, CPF nº _____
permito a captação, o uso e publicação de meus registros
(fotográficos, radiografias, tomografias e respectivos laudos odontológicos e médicos,
vídeo imagens, amostra de voz/fala, registros clínicos, imagens de órgãos e espécimes)
para pesquisa, fins didáticos e publicação de artigos científicos especificamente relacionados
ao projeto de pesquisa intitulado "Microrrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais
complexas", sob responsabilidade da pesquisadora Rosana Maria Candido de Souza Sandri.
Estou ciente de que não serei remunerado(a) pelo uso desses registros.

Entendo que poderei ser reconhecido(a) por terceiros e que as minhas documentações clínicas
poderão ser publicadas exclusivamente para fins científicos, resguardando o sigilo das minhas
informações pessoais.

Estou ciente de que, caso não aceite assinar este termo, receberei dos profissionais citados acima
a mesma qualidade de atendimento e tratamento.

_____, _____ de _____ de 20____.

Assinatura: _____
Nome do Paciente: _____

Em caso de paciente menor de 18 anos:

Eu, _____, brasileiro____, residente no
endereço _____, na
cidade de _____ - _____, RG nº _____, CPF nº _____
_____, responsável legal pelo
paciente _____, permito a captação, o uso e
publicação de seus registros para fins científicos, de acordo com as condições expressas acima,
que foram explicadas de forma clara.

Assinatura do responsável pelo paciente: _____
Nome do responsável pelo paciente: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

ANEXO

ANEXO A – Ofício de aprovação do CEP **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Microrrearranjos cromossômicos em síndromes craniofaciais complexas

Pesquisador: Rosana Maria Candido de Souza Sandri

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 61744216.6.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.905.366

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado de autoria da aluna Rosana Maria Candido de Souza Sandri sob a orientação e responsabilidade do Dr. Antonio Richieri da Costa e coorientação da Dra. Roseli Maria Zechi Ceide. Serão incluídos neste estudo, descrito como de caráter observacional qualitativo, 100 indivíduos pertencentes à casuística do HRAC/USP, com múltiplas anomalias congênitas associadas a atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição da fala, diagnóstico sindrômico não estabelecido e cariótipo de bandamento G normal prévio. Serão excluídos, nesta pesquisa, os indivíduos com múltiplas anomalias com provável etiologia ambiental. Será colhido de cada indivíduo uma amostra de sangue periférico (3 ml), por meio de venipunção, para análise citogenética molecular. A proposta é investigar microrrearranjos cromossômicos visando identificar regiões cromossômicas/locos gênicos responsáveis pelas manifestações fenotípicas e, dessa forma, contribuir para o diagnóstico, compreensão do fenótipo e identificação de novos genes candidatos às anomalias craniofaciais. Para a investigação das alterações cromossômicas será utilizada a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) para regiões subteloméricas. Assim, espera-se a identificação da causa genética, melhorando as condições de diagnóstico, conduta terapêutica e aconselhamento genético às famílias.

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20

Bairro: Vila Nova Cidade Universitária

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 1.905.366

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar regiões cromossômicas candidatas às síndromes craniofaciais complexas.

Objetivos Secundários:

- Investigar possíveis alterações citogenéticas, por meio da técnica de MLPA, em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou atraso na aquisição de fala, sem diagnóstico genético-clínico definido e com cariótipo de bandamento G prévio normal;
- Estabelecer possível correlação entre o fenótipo dos indivíduos e as regiões cromossômicas alteradas;
- Identificar, quando possível, pontos do genoma relacionados às fissuras labiopalatinas;
- Fornecer subsídios para a definição e aumento do diagnóstico genético-clínico e, consequentemente, para o aconselhamento genético à família.

Os autores mencionam como hipótese que, uma das possibilidades para explicar esses fenótipos complexos é que, pelo menos em parte, estejam associados a alterações cromossômicas submicroscópicas raras, não visualizadas na citogenética convencional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto tem maior possibilidade de trazer benefícios, do que de causar danos aos participantes da pesquisa, sendo, portanto, eticamente adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem mérito científico com vasta revisão de literatura. Apresenta cunho de grande importância, pois visa, além de aumentar a probabilidade de um número maior de diagnósticos, a implantação da técnica MLPA na rotina de atendimentos na Seção de Genética Clínica e Biologia Molecular do HRAC-USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos já foram apresentados, anteriormente, de forma adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As adequações solicitadas no parecer anterior, referentes à compatibilização dos campos da Plataforma Brasil (metodologia proposta, critério de inclusão e SIM para uso de fontes secundárias)

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária CEP: 17.012-900
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 1.905.366

com os arquivos anexados, foram realizadas.

Considerando, portanto, que a nova versão do projeto se encontra de acordo com as normas da Resolução CNS 466/12, sugiro parecer "aprovado".

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deve atentar que o projeto de pesquisa aprovado por este CEP refere-se ao protocolo submetido para avaliação. Portanto, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado", se caso houver alterações nesse projeto, este CEP deverá ser comunicado em emenda via Plataforma Brasil, para nova avaliação.

Cabe ao pesquisador notificar via Plataforma Brasil o relatório final para avaliação. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos e/ou outros Termos obrigatórios assinados pelos participantes da pesquisa deverão ser entregues ao CEP. Os relatórios semestrais devem ser notificados quando solicitados no parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_811193.pdf	09/01/2017 11:54:28		Aceito
Outros	OFICIO_Resposta_Parecer_Consubstanciado_1868473.pdf	09/01/2017 11:31:26	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	OFICIO_RESPOSTA_PARECER_1845901.pdf	06/12/2016 09:31:27	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	termo_manuseio_informacoes.pdf	06/12/2016 09:29:27	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DETALHADO.pdf	06/12/2016 09:08:08	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_II.pdf	06/12/2016 09:03:56	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	06/12/2016 09:03:03	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	Term_Perm_Uso_Registro_Fins_Cientificos.pdf	04/12/2016 10:51:36	Rosana Maria Candido de Souza	Aceito

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
 Bairro: Vila Nova Cidade Universitária CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 1.905.366

Outros	Term_Perm_Uso_Registro_Fins_Cientificos.pdf	04/12/2016 10:51:36	Sandri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_familiares.pdf	04/12/2016 10:39:54	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_participante.pdf	04/12/2016 10:39:25	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	Checklist_Prot_Pesq_86_2016.pdf	08/11/2016 08:47:31	Rafael Mattos de Deus	Aceito
Outros	Term_Comp_Tornar_Publico_Dest_Mat.pdf	03/11/2016 19:40:03	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	Term_Comp_Pesq_Resp.pdf	03/11/2016 19:35:03	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	03/11/2016 19:31:44	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_INSTITUICAO_INFRAESTRUTURA.pdf	25/10/2016 20:01:58	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termos_Consentimento_Assentimento.pdf	21/10/2016 12:15:58	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito
Outros	ENCAMINHAMENTO_CEP.pdf	21/10/2016 11:54:05	Rosana Maria Candido de Souza Sandri	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 02 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Renata Paciello Yamashita
(Coordenador)

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária CEP: 17.012-900
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: cephrac@usp.br