

Yanca Gasparini de Oliveira

Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento global  
e mosaicismo pigmentar

São Paulo

2022

YANCA GASPARINI DE OLIVEIRA

**Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento  
global e mosaicismo pigmentar**

**Versão Original**

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

Programa: Pediatria

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici  
Kulikowski

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Yanca Gasparini de  
Investigação citogenômica em pacientes com atraso  
de desenvolvimento global e mosaicismos pigmentar /  
Yanca Gasparini de Oliveira. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Pediatria.  
Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Mosaicismo 2.Doenças raras  
3.Rearranjos genômicos 4.Testes genéticos 5.Variação  
do número de cópias de DNA 6.Análise de sequência  
com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/DBD-511/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Oliveira YG. Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento global e mosaicismo pigmentar [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

# Dedicatória

---

Dedico este trabalho aos meus pais, **Alex**  
e **Talita**, que sempre me apoiaram em  
todos os meus sonhos e objetivos e este é  
mais um que estamos conquistando juntos!

# Agradecimientos

---

Agradeço primeiramente a **Deus** pela oportunidade de poder realizar este objetivo pessoal e profissional, me dando muita garra, força e determinação para finalizá-lo!

Aos meus pais, **Alex e Talita**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, com muito amor e carinho. Vocês são a minha maior força e meus maiores exemplos de vida. Amo vocês! Obrigada por acreditarem em mim!

Ao meu companheiro, **Rafael**, por todo o seu amor, sua paciência e admiração. Você tem sido essencial para a conclusão deste estudo, me transmitindo sempre boas energias e muita confiança de que eu poderia finalizá-lo com muito sucesso! Amo você!

Aos meus avós **Leila, Marilu e Marcelo**, que sempre cuidaram tão bem de mim, com muito carinho, zelo e amor. Sou muito grata a todos ensinamentos e toda a torcida pelas minhas realizações. Amo vocês!

À toda a minha família, que sempre esteve na torcida por mim e me apoiando. Deixo um agradecimento em especial a minha madrinha **Luci** (*in memoriam*) que deixou ótimas memórias e a sua alegria contagiante, e a minha tia-avó **Lina** que é uma avó para mim e sempre me deu apoio e força para as minhas realizações. Estendo os meus agradecimentos aos meus sogros **Rose e Jair**, que estão nesta torcida por mim. Obrigada a todos pelo carinho!

Aos meus primos **Aline e Carlos**, que sempre foram tão companheiros de tudo, me ensinando e transmitindo muito amor e carinho. Nós pudemos viver tantos momentos bons juntos, tantas risadas, viagens, diversões, e não seria agora que não íamos passar mais um momento importante juntos. Amo vocês!

A minha melhor amiga **Tayná**, que há mais de 10 anos trilha uma história comigo, estando ao meu lado, e que não mede forças para me apoiar. Amo você! Você faz uma enorme falta no meu dia a dia.



A minha “eterna” professora **Áurea Moreira**, que desde o ensino médio me apoiou e foi quem abriu as portas para eu trilhar este caminho na pesquisa. Sou eternamente grata a ti por ter visto em mim algo especial e me dado asas para voar!

À minha querida mentora e amiga **Marília Montenegro**, que também acreditou em mim quando eu era apenas uma garota recém universitária e queria viver um sonho. Você me deu a oportunidade de realizar este sonho, me ensinou muito e me ensina até hoje. Obrigada pelos conselhos, sempre!

À minha querida orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dra. Leslie Domenici Kulikowski**, por desde a Iniciação científica ter acreditado no meu potencial, me dando a oportunidade de crescer dentro da pesquisa. Você sempre apoiando, dando ótimos conselhos e o melhor, sempre muito animada, trazendo esperanças e alegria para o dia a dia!

Aos meus antigos companheiros de laboratório, **Gil, Évelin, Ale, Samar e Roberta**, vocês foram ótimos professores e companheiros, sempre trazendo muitas discussões pertinentes, contribuições no trabalho e pelas conversas e momentos de alegria os quais eu sempre irei lembrar com muito carinho.

Aos meus companheiros de laboratório durante esses quatro anos de doutorado, **Vanessa, Beatriz, Gleyson, Amom e Lucas**, nós crescemos e aprendemos muitas coisas juntos. Obrigada pelas conversas, risadas e claro, não posso deixar de falar de todas as experiências gastronômicas que passamos juntos, que foram essenciais para a finalizar este trabalho.

À **Profa. A Dra. Chong Ae Kim**, pela grande contribuição neste trabalho e pelo lindo trabalho com os pacientes atendidos no Ambulatório de Genética. Aproveito para estender meus agradecimentos aos **médicos e residentes** do Serviço de Genética, pelos auxílios, amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos **pacientes** e seus **familiares** que contribuíram com este estudo. Vocês são esperança!

À **FAPESP** por viabilizar o financiamento deste estudo.

Ao **Departamento de Pediatria** por todo o auxílio durante esses anos de pesquisa.

Epígrafe

---

*“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, é também uma criança que está diante dos fenômenos naturais, que o impressionam como um conto de fadas.”*

*- Marie Curie*

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

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

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

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

# Sumário

---

## SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de quadros

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

*Abstract*

1. INTRODUÇÃO .....	30
1.1. O mosaicismismo .....	31
1.2. Etiologia do mosaicismismo genético .....	36
1.3. Mosaicismismo cromossômico .....	37
1.4. Mosaicismismo epigenômico .....	40
1.5. Mosaicismismo genômico .....	41
1.6. Investigação de mosaicismismo pela citogenômica .....	45
2. OBJETIVOS .....	51
2.1. Objetivo geral .....	51
2.2. Objetivos secundários .....	51
3. MÉTODOS .....	53
3.1. Casuística .....	53
3.2. Métodos .....	54
3.2.1. Cultura de linfócitos obtidos a partir de sangue periférico .....	54
3.2.2. Cultura de fibroblastos a partir de biópsia cutânea .....	55
3.2.3. Estudo citogenético por bandamento G .....	57
3.2.4. Extração de DNA genômico .....	57
3.2.5. Integridade e quantificação das amostras de DNA .....	58
3.2.6. Triagem genômica por array .....	58
3.2.7. Análise dos dados .....	60
3.2.8. Interpretação e classificação das CNVs .....	62
4. RESULTADOS .....	66
4.1. Integração de dados e detecção de mosaicismismo .....	72

4.2. Correlação genótipo-fenótipo .....	73
- Alterações cromossômicas numéricas .....	73
- Deleções, duplicações e ROH .....	75
- Sem alterações .....	79
4.2.1. Fenótipo clínico .....	79
5. DISCUSSÃO .....	82
5.1. Alterações cromossômicas numéricas .....	83
5.2. Deleções, duplicações e ROH .....	85
- Pacientes Y01 e Y08 .....	86
- Pacientes Y02 .....	87
- Paciente Y14 .....	88
5.3. Pacientes sem alterações .....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
7. CONCLUSÕES .....	93
8. ANEXOS .....	95
ANEXO A: Parecer consubstanciado do CEP .....	95
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	99
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
APÊNDICES .....	110



**Listas**

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Exemplos das classificações do mosaicismismo e a distribuição das células alteradas no corpo humano .....	32
<b>Figura 2</b>	Variáveis que contribuem para a variabilidade fenotípica de alterações genômicas em mosaico .....	33
<b>Figura 3</b>	Padrões de pigmentação do mosaicismismo cutâneo .....	35
<b>Figura 4</b>	Padrões de pigmentação do mosaicismismo cutâneo .....	35
<b>Figura 5</b>	Etiologia do mosaicismismo genético .....	37
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática dos mecanismos que levam ao mosaicismismo cromossômico .....	40
<b>Figura 7</b>	CNVs recorrentes e CNVs não recorrentes .....	43
<b>Figura 8</b>	Exemplificação de mecanismos que originam as variações no número de cópias .....	44
<b>Figura 9</b>	Representação da detecção de distintos níveis de mosaicismismo genético dentro de um único tecido celular (sangue periférico)...	48
<b>Figura 10</b>	Imagem ilustrativa do procedimento de cultura de fibroblastos...	55
<b>Figura 11</b>	Imagem ilustrativa do crescimento adequado para cultura de fibroblastos.....	56
<b>Figura 12</b>	Fluxograma da técnica de <i>array</i> da plataforma Illumina.....	59
<b>Figura 13</b>	Parâmetros utilizados no <i>software BlueFuse™ Multi v4.4</i> para análise das CNVs e das ROHs por meio da técnica de <i>array</i> .....	61
<b>Figura 14</b>	Exemplos de resultados obtidos por meio da técnica de <i>array</i> ...	62
<b>Figura 15</b>	Métrica de classificação de variantes de número de cópias (CNVs)	
<b>Figura 16</b>	Fluxograma dos resultados de cariotipagem por bandamento G de sangue periférico.....	66
<b>Figura 17</b>	Fluxograma dos resultados de cariotipagem por bandamento G de fibroblastos.....	67
<b>Figura 18</b>	Fluxograma dos resultados de <i>array</i> genômico.....	68
<b>Figura 19</b>	Cariogramas de fibroblastos dos pacientes .....	74
<b>Figura 20</b>	Imagem demonstrativa das alterações visualizadas no <i>array</i> .....	75
<b>Figura 21</b>	Imagem demonstrativas das alterações visualizadas no <i>array</i> ....	76
<b>Figura 22</b>	Imagem demonstrativas das alterações visualizadas no <i>array</i> ....	77

<b>Figura 23</b>	Cariograma de sangue periférico da paciente Y14 .....	78
<b>Figura 24</b>	Imagem demonstrativas das alterações visualizadas no <i>array</i> .....	78
<b>Figura 25</b>	Compilação fotográfica dos pacientes do estudo.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Resultados obtidos pelas técnicas de cariotipagem por bandamento G e array genômico .....	69
<b>Tabela 2</b>	Compilação dos fenótipos clínicos apresentados pelos pacientes deste estudo .....	79

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Comparação de detecção de alterações genômicas entre as técnicas de cariotipagem clássica e de array utilizando amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral ..... 72
- Gráfico 2** Elucidação das alterações genômicas detectadas neste estudo pela técnica de array utilizando amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral, que fazem relação com os fenótipos clínicos apresentado pelos pacientes ..... 73

## LISTA DE ABREVIATURAS

arr	<i>Array</i> genômico
del	Deleção
Dr. <sup>a</sup>	Doutora
dup	Duplicação
et al.	E outros (as)
InDels	Inserções e deleções de nucleotídeos

## LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
/	Barra
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo do cromossomo
cm <sup>2</sup>	Centrímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
g	Gramas
°C	Grau Celsius
kb	Kilobase
®	Marca registrada
mers	Sequência de nucleotídeos
Mb	Megabase
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µL	Microlitro
ng	Nanograma
pb	Par de base
%	Porcentagem
<i>TM</i>	<i>Trademark</i> (marca comercial)
x	Vezes

## LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ADG	Atraso de Desenvolvimento Global
BAF	<i>B Allele Frequency</i>
C	Citosina
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CGH-array	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CIV	Comunicação Interventricular
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
ClinGen	<i>Clinical Genome Resource</i>
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>
DI	Deficiência Intelectual
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
G	Guanina
GDD	<i>Global Developmental Delay</i>
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hg19	Human Genome 19
ICr	Instituto da Criança
ISCN	<i>International System for Human Chromosome Nomenclature</i>
JUP	Junção Ureteriopélvica
KdVS	<i>Koolen-De-Vries Syndrome</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LRR	<i>Log R Ratio</i>
MP	Mosaicismo Pigmentar
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>



NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PM	<i>Pigmentary mosaicism</i>
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
ROH	<i>Runs of Homozygosity</i>
rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	<i>Single Nucleotide Variants</i>
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UPD	<i>Uniparental Disomy</i>
VUS	<i>Variants of Uncertain Significance</i>

# Resumo e Abstract

## RESUMO

Oliveira, Y.G. Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento global e mosaicism pigmentar [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O mosaicism é um evento frequente na população em geral, cuja frequência em casos que levam a efeitos fenotípicos é estimada em aproximadamente 1 para 10.000 nascidos vivos. Contudo, é pouco identificado devido à dificuldade de caracterização citogenética e molecular que pode ocorrer em diferentes populações celulares. A detecção de alterações genômicas em diferentes tecidos utilizando as técnicas citogenômicas pode revelar elementos importantes para o entendimento da relação entre a arquitetura genômica e seu efeito fenotípico para assim auxiliar na conclusão diagnóstica dos pacientes com atraso de desenvolvimento global e mosaicism pigmentar. Estudamos 21 conjuntos de amostras de pacientes com ADG/MP (14 do sexo feminino e 7 do sexo masculino) por bandamento G e *array* genômico, totalizando 84 amostras. Nosso estudo revelou 39 alterações classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas permitindo o diagnóstico de 13/21 pacientes deste estudo. Observamos que a pele (fibroblastos) foi o tecido com um maior número de alterações patogênicas, fato este, relacionado com o mosaicism pigmentar e, ressaltamos que o *array* genômico foi essencial para a caracterização molecular inequívoca de cada população celular, dada a facilidade de obtenção de DNA de qualquer tipo de amostra. Ainda foi possível observar que o *array* genômico possibilitou o diagnóstico dos pacientes e a detecção de mosaicism em diferentes níveis. Concluindo, nosso estudo mostrou que a associação genótipo-fenótipo, considerando distintos tecidos, é imprescindível para a rotina diagnóstica de pacientes com ADG/MP. Bem como melhora o entendimento do papel da dosagem gênica, inter e intratecidual, e sua relação com as manifestações clínicas.

**Descritores:** Mosaicism; Doenças raras; Rearranjos genômicos; Testes genéticos; Variação do número de cópias de DNA; Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos.

## ABSTRACT

Oliveira, Y.G. Citogenomic investigation in patients with developmental delay and pigmentary mosaicism [Dissertation]. São Paulo “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Mosaicism is a frequent event in the general population, whose frequency in cases that lead to phenotypic effects is estimated at approximately 1 in 10.000 live births. However, it is poorly identified due to the difficulty of cytogenetic and molecular characterization that can occur in different cell populations. The detection of genomic alterations in different tissues using cytogenomic techniques can reveal important elements for understanding the relationship between genomic architecture and its phenotypic effect, thus helping in the diagnostic conclusion of patients with global developmental delay and pigmentary mosaicism. We studied 21 sets of samples from patients with GDD/PM (14 females and 7 males) by G-banding and genomic array, totaling 84 samples. Our study revealed 39 alterations classified as pathogenic or probably pathogenic, allowing the diagnosis of 13/21 patients in this study. We observed that the skin (fibroblasts) was the tissue with the highest number of pathogenic alterations, a fact related to pigmentary mosaicism, and we emphasize that the genomic array was essential for the unequivocal molecular characterization of each cell population, given the ease of obtaining of DNA from any type of sample. It was also possible to observe that the genomic array enabled the diagnosis of patients and the detection of mosaicism at different levels. In conclusion, our study showed that the genotype-phenotype association, considering different tissues, is essential for the diagnostic routine of patients with GDD/PM. As well as improving the understanding of the role of gene dosage, inter and intra-tissue, and its relationship with clinical manifestations.

**Descriptors:** Mosaicism; Rare diseases; Genomic rearrangements; Genetic tests; DNA copy number variations; Oligonucleotide array sequence analysis.

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A heterogeneidade cromossômica, manifestada como mosaicismismo genômico, está associada a uma variedade de síndromes genéticas. Devido à capacidade de mudar dinamicamente ao longo da ontogenia, o mosaicismismo pode mediar a instabilidade do genoma, a diversidade genética intercelular e interindividual, o desenvolvimento pré-natal e o envelhecimento (Iourov *et al.*, 2019). Nesse contexto, é plausível que o mosaicismismo esteja relacionado a um amplo espectro de doenças.

Na literatura, é observado que pacientes com alterações em mosaico apresentam um padrão de manchas cutâneas sob o corpo na forma de linhas de Blaschko, e este fato está relacionado com o mosaicismismo pigmentar. Esse, que é bem observado em pacientes que apresentam um quadro clínico de ADG e/ou DI associados a malformações congênitas. No entanto, nem sempre, estes casos são adequadamente identificados e/ou caracterizados, e, isto atribui-se a dificuldade de investigação da alteração genômica em diferentes tecidos (Frank e Happle, 2007; Biesecker e Spinner, 2013; Lupski, 2013). Devido à grande incidência e importância na espécie humana, é de grande valia entender os mecanismos causadores do mosaicismismo ao longo do desenvolvimento, bem como associar esse evento às consequências clínicas.

O termo mosaico foi cunhado no período medieval em que eram construídas figuras formadas pela incrustação de pequenos materiais distintos e de diferentes cores, formando assim um mosaico de cores. Na genética, este termo veio a ser utilizado e denominado em 1936, por Curt Stern, em um estudo com *Drosophila*. Este estudo demonstrou que o *crossing over* mitótico poderia levar a uma “mistura” de células geneticamente distintas, sendo denominado este evento como mosaicismismo (Spinner e Conlin, 2014).

## 1.1 O mosaicismo

O mosaicismo genético é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente distintas derivadas de um único zigoto, presentes em um mesmo indivíduo. Este evento genético pode levar a abortos espontâneos, múltiplas malformações congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), malformações cerebrais focais, manchas cutâneas pigmentares e, o câncer. No entanto, este deve ser bem caracterizado para que não seja confundido com o quimerismo. Entidade em que ocorre a presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente distintas, como resultado da fusão de dois zigotos diferentes em um único embrião. Sendo este um evento frequentemente reconhecido quando há a presença de linhagens celulares 46,XX/46,XY que, por vezes, se manifestam clinicamente e são facilmente discerníveis geneticamente (Conlin *et al.*, 2010; Lupski, 2013; Gajecka, 2016; Martínez-Glez *et al.*, 2020; Kawamura *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).

O mosaicismo será estabelecido conforme a população celular em que a alteração estiver presente, podendo estar em um mesmo tecido (intratecidual) ou em tecidos distintos (intertecidual), sendo este resultado de uma alteração no tecido germinativo ou no tecido somático (Youssoufian e Pyeritz, 2002; Conlin *et al.*, 2010).

Recentemente, foi descrito na literatura, um padrão de classificação de atributos para o mosaicismo. Um deles é o padrão que indica o tecido afetado, levando em consideração a sua localização e a capacidade de transmitir a alteração genômica para as células que irão ser geradas. Na Figura 1, podemos visualizar as classificações do mosaicismo, descritos na literatura, que são eles: somático, germinativo, gonadossomático e placentário (Martínez-Glez *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).

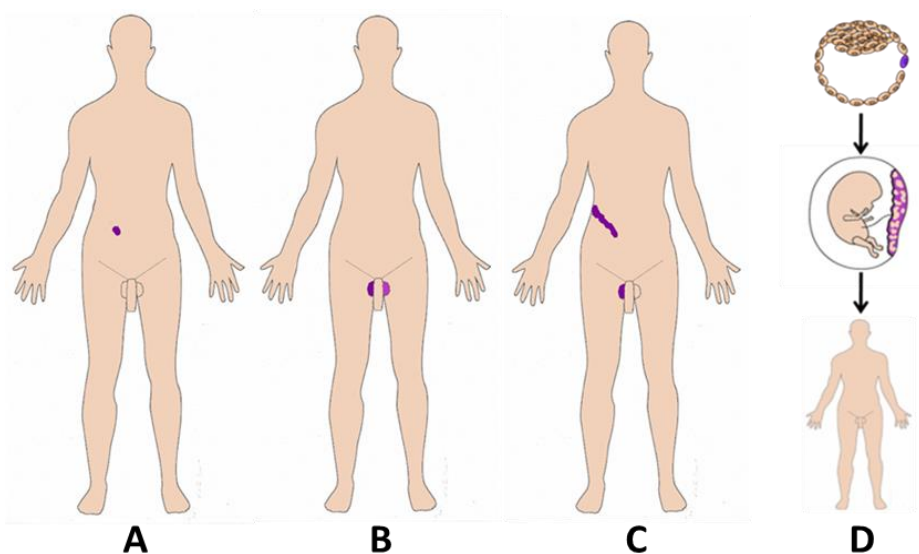
O mosaicismo somático (Figura 1A), é aquele em que há o envolvimento de todas as células do corpo humano, excluindo-se as células germinativas, e que tem como resultado as consequências fenotípicas para o indivíduo, que irá depender da extensão de células e/ou tecidos que foram afetados (Taylor *et al.*, 2014; Campbell *et al.*, 2015; Martínez-Glez *et al.*, 2020). Este, é o tipo de mosaicismo mais comumente relatado, visto em doenças cutâneas, vasculares e de supercrescimento, como nevos, tumores de pele e entre outras doenças.

Além de, ser o principal mecanismo do câncer (Foulkes e Real, 2013; Martínez-Glez *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).

Já o mosaicismismo germinativo (Figura 1B), ocorre exclusivamente nos gametas (ovários e testículos), sendo esta uma linhagem de difícil acesso para estudo. Porém, sabe-se que indivíduos com alterações genômicas presentes apenas nas gônadas podem gerar proles afetadas. Este mecanismo já foi observado em algumas síndromes bem descritas, como Osteogênese imperfeita tipo II, uma doença de padrão autossômico dominante, em que foi relatado a presença da mesma variante genômica em proles de genitores não afetados (Pyott *et al.*, 2011, Taylor *et al.*, 2014; Martínez-Glez *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).

O mosaicismismo gonadossômico (Figura 1C), anteriormente conhecido como gonossômico, é uma combinação de ambos os mosaicismismos citados acima, envolvendo assim ambos os tipos celulares (Taylor *et al.*, 2014; Campbell *et al.*, 2015; Martínez-Glez *et al.*, 2020).

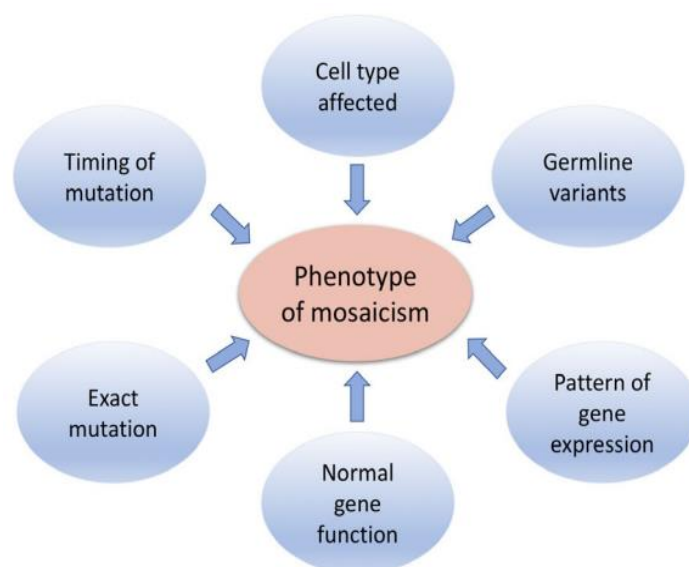
E ainda, há o mosaicismismo placentário (CPM, do inglês **Confined Placental Mosaicism**), cujo apenas o tecido placentário é afetado e a alteração genômica não se propaga ao feto (Figura 1D). No entanto, o CPM tem sido associado a restrição de crescimento intrauterino, abortos espontâneos, natimortos e função placentária anormal (Taylor *et al.*, 2014; Martínez-Glez *et al.*, 2020).



**Figura 1** – Exemplos das classificações do mosaicismismo e a distribuição das células alteradas no corpo humano. (A) Mosaicismismo somático. (B) Mosaicismismo germinativo. (C) Mosaicismismo gonadossômico. (D) Mosaicismismo placentário (Modificado de Martínez-Glez *et al.*, 2020).



Com base no tecido de origem, o tipo de alteração genômica, o período de desenvolvimento embrionário em que surgiu uma nova linhagem celular e o padrão de expressão gênica, o mosaicismos pode gerar distintos efeitos fenotípicos, desde a perda precoce da gravidez até a uma patologia específica de um órgão (Figura 2). E inclusive, pode modificar os fenótipos e sua gravidade em uma síndrome já bem estabelecida. Como exemplo na Síndrome de Down, em que foi descrito a trissomia na forma de mosaicismos, onde o indivíduo apresentou um fenótipo mais brando, sem problemas cardíacos, com um tônus muscular adequado e desenvolvimento normal dos marcos motores, o que são fenótipos comumente observados em pacientes com a trissomia livre do 21 (Lombillo e Sybert, 2005; Frank e Happle, 2007; Taylor *et al.*, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015; Kinsler *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).



**Figura 2** – Variáveis que contribuem para a variabilidade fenotípica de alterações genômicas em mosaico (FONTE: Kinsler *et al.*, 2020).

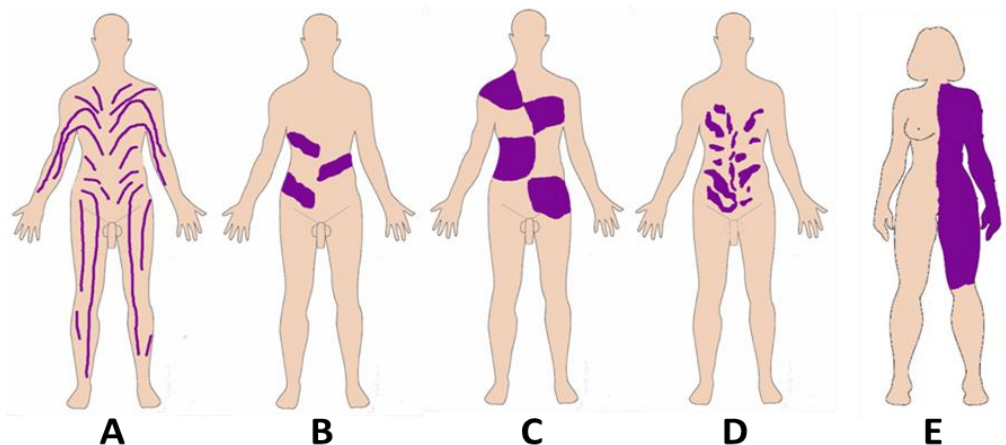
Segundo a literatura, algumas das consequências fenotípicas associadas ao mosaicismos são as malformações congênitas, dismorfismos, anomalias de pigmentação e DI, quando o tecido cerebral estiver envolvido (Taylor *et al.*, 2014; Sekar *et al.*, 2020). Esta variedade de fenótipos está relacionada à porcentagem de mosaicismos presente em um mesmo indivíduo, seja no mesmo tecido ou em tecidos distintos. Esta porcentagem também é responsável por minimizar

fenótipos clínicos que, em estado de não mosaico, poderiam ser mais abrangentes (Lombillo e Sybert, 2005; Frank e Happle, 2007).

Alterações em mosaico em linhagens ectodérmicas que formam o tecido da pele (epitélio estratificado pavimentoso queratinizado) e algumas mucosas (epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado) estão frequentemente associados a alterações pigmentares e anomalias congênitas do sistema nervoso central (SNC). Este fato é associado, na literatura, com o mosaicismo confinado a tecidos, ou seja, o mosaicismo pigmentar (MP) que pode expressar diferentes padrões de manchas cutâneas em todo o corpo.

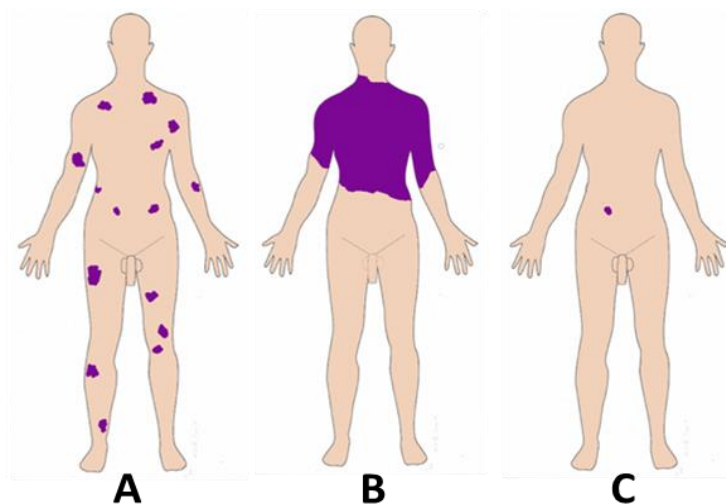
O MP é um termo que descreve padrões variados de pigmentação na pele ocasionada pela heterogeneidade genética das células deste tecido. Em um número substancial de casos, o mosaicismo pigmentar é observado concomitantemente com anormalidades extra cutâneas, tipicamente envolvendo o sistema nervoso central e musculoesquelético, que determinam um quadro clínico heterogêneo (Lim, Moscato, Choate, 2017; Kromann *et al.*, 2018). O MP inclui diferentes padrões de hipopigmentação e/ou hiperpigmentação cutânea, que seriam explicadas por alterações genéticas que interrompem a expressão gênica de genes relacionados a pigmentação, bem como a sua função (Kromann *et al.*, 2018). Estes padrões de pigmentação são divididos em dois grandes grupos: segmentares e não segmentares.

Os segmentares envolvem um padrão de pigmentação que diversas áreas corporais respeitando a linha média. São eles, as linhas de Blaschko, podendo se apresentar como linhas estreitas ou largas (Figura 3A e 3B), o padrão em xadrez ou quadriculado, caracterizado pela alternância de quadrados de hiperpigmentação com separação acentuada na linha média (Figura 3C), padrão filóide com máculas semelhantes a folhas (Figura 3D) e lateralização (Figura 3E) (Lombillo e Sybert, 2005; Frank e Happle, 2007; Biesecker e Spinner, 2013; Kromann *et al.*, 2018).



**Figura 3** – Padrões de pigmentação do mosaicismo cutâneo. (A) Linhas de Blaschko estreitas. (B) Linhas de Blaschko largas. (C) Padrão em xadrez ou quadriculado. (D) Padrão filóide. (E) Lateralização da linha média (adaptado de Martínez-Glez *et al.*, 2020).

Já os não segmentares, envolve os padrões: disseminado (Figura 4A), irregular sem separação da linha média (Figura 4B) e o confinado a um único local (Figura 4C).



**Figura 4** – Padrões de pigmentação do mosaicismo cutâneo. (A) Padrão de pigmentação disseminado. (B) Padrão irregular sem separação da linha média. (C) Padrão confinado ao local (adaptado de Martínez-Glez *et al.*, 2020).

Deste modo, as nuances dessas observações clínicas foram prescientes e resultaram na construção de várias hipóteses fundamentadas na ideia de que as alterações genômicas concomitantes em diferentes tecidos poderiam explicar padrões incomuns de fenótipos dentro da mesma doença (Biesecker e Spinner, 2013).

## 1.2 Etiologia do mosaicismo genético

Com o avanço da ciência ao longo dos anos, é difícil ainda assumir o fato de que todas as células de um corpo humano compartilham genomas idênticos. De fato, estudos recentes de célula única demonstraram que há uma variabilidade genômica intercelular entre distintos tecidos, sugerindo assim de que todos os seres humanos podem ser um mosaico geneticamente falando (Iourov *et al.*, 2019).

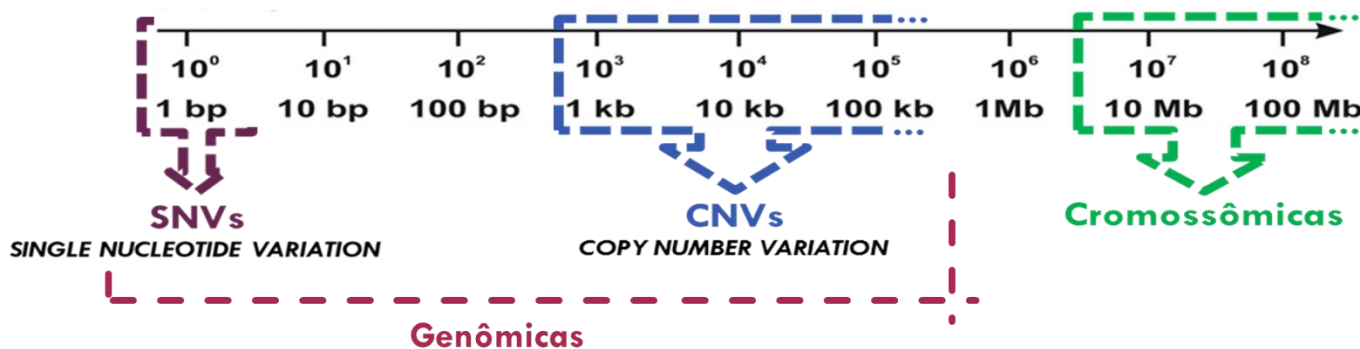
A variabilidade genômica intercelular vem sendo foco de pesquisa genética por mais de 50 anos. Foi repetidamente demonstrado que a heterogeneidade genômica que se manifesta sob a condição de mosaico está associada a uma variedade de doenças humanas.

Devido à capacidade de mudar dinamicamente ao longo da ontogenia, o mosaicismo pode mediar a instabilidade do genoma e a diversidade intercelular na saúde e na doença. No entanto, a ubiquidade de populações insignificantes de células com cariótipos anormais resulta em dificuldades de interpretação e detecção, que podem ser resolvidas por tecnologias genômica que possuem uma maior acurácia de detecção. Na era pós-genômica, tornou-se possível descobrir caminhos moleculares e celulares para instabilidade genômica usando tecnologias avançadas de varredura de genoma completo e ferramentas de bioinformática. Além disso, as oportunidades para determinar o efeito de alterações genômicas, sejam elas cromossômicas ou variação de um único nucleotídeo, sob fenótipo celular parecem ser úteis para desvendar as consequências intrínsecas do mosaicismo genético (Iourov *et al.*, 2019)

Assim, a abordagem do nosso estudo, investigando o mosaicismo cromossômico/genômico nos contextos ontogênico e patogênico tornou-se imprescindível para a identificação e compreensão do fenótipo clínico em pacientes com mosaicismo pigmentar associado ao atraso global de desenvolvimento.

O mosaicismo pode ocorrer para qualquer tipo de alteração (Figura 5), seja ela em nível cromossômico decorrente de erros na segregação (mosaicismo cromossômico), ou a nível molecular devido a defeitos de replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA (mosaicismo genômico). Sendo assim, o mosaicismo será denominado conforme o tipo de alteração que estiver envolvida e estas

alterações podem causar mudanças e danos na expressão gênica e/ou na função proteica (Frank e Happle, 2007; Lupski, 2013; Sekar *et al.*, 2020; Thorpe *et al.*, 2020).



**Figura 5** – Etiologia do mosaicismo genético. Este pode ocorrer para alterações a nível cromossômico, envolvendo alterações estruturais ou numéricas, e também alterações menores, a nível da dupla fita de DNA, como as CNVs e variações de um único nucleotídeo (Imagens provenientes do Laboratório de Citogenômica, LIM03, cortesia da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski).

### 1.2.1 Mosaicismo cromossômico

O mosaicismo cromossômico é aquele em que a alteração envolverá diretamente o cromossomo, podendo, por muitas vezes, ser observada ao microscópio óptico pela técnica de bandamento G quando for maior do que 5 Mb de tamanho (Taylor *et al.*, 2014; Gajecka, 2016).

Em geral, este tipo de mosaicismo é comumente observado nos casos de alterações numéricas, como as aneuploidias ou euploidias. Porém, também são descritos na literatura casos de mosaicismo envolvendo alterações estruturais, como translocações, cromossomos marcadores, cromossomos em anel, inversões e isocromossomos (Kulikowski *et al.*, 2005; Conlin *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2014; Gajecka, 2016). Como exemplo, na Síndrome de Pallister-Kilian, um isocromossomo do braço curto do cromossomo 12 extra (+iso(12p)) é observado na forma de mosaicismo intertecidual, ou seja, está presente quase que exclusivamente nos fibroblastos e medula óssea dos pacientes acometidos pela doença, sendo raramente observado em sangue periférico (Thakur *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021).

O mosaicismo cromossômico pode ser decorrente dos seguintes mecanismos genéticos: erro de não disjunção mitótica ou meiótica, atraso anafásico e resgate trissômico.

É de suma importância lembrar que durante as divisões celulares há mecanismos de *checkpoint* para assegurar de que a segregação dos cromossomos esteja ocorrendo de forma adequada. No entanto, durante os estágios pré-implantacionais e as primeiras divisões celulares do zigoto, não há um mecanismo de *checkpoint* eficiente, levando assim a uma má-segregação e subsequente alterações cromossômicas em mosaicos estão sujeitas a acontecerem (Taylor *et al.*, 2014).

A não-disjunção cromossômica durante o ciclo celular mitótico, pode gerar uma célula com monossomia e outra com trissomia (Figura 6A), sendo este um evento pós-zigótico, podendo envolver os cromossomos autossomos (1-22) e os sexuais (X e Y). Neste caso, se a não-disjunção ocorrer antes da diferenciação celular, o mosaicismo estará presente em todos os tecidos. No entanto, se o erro ocorrer após a diferenciação, o mosaicismo será confinado a tecidos específicos (Taylor *et al.*, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015).

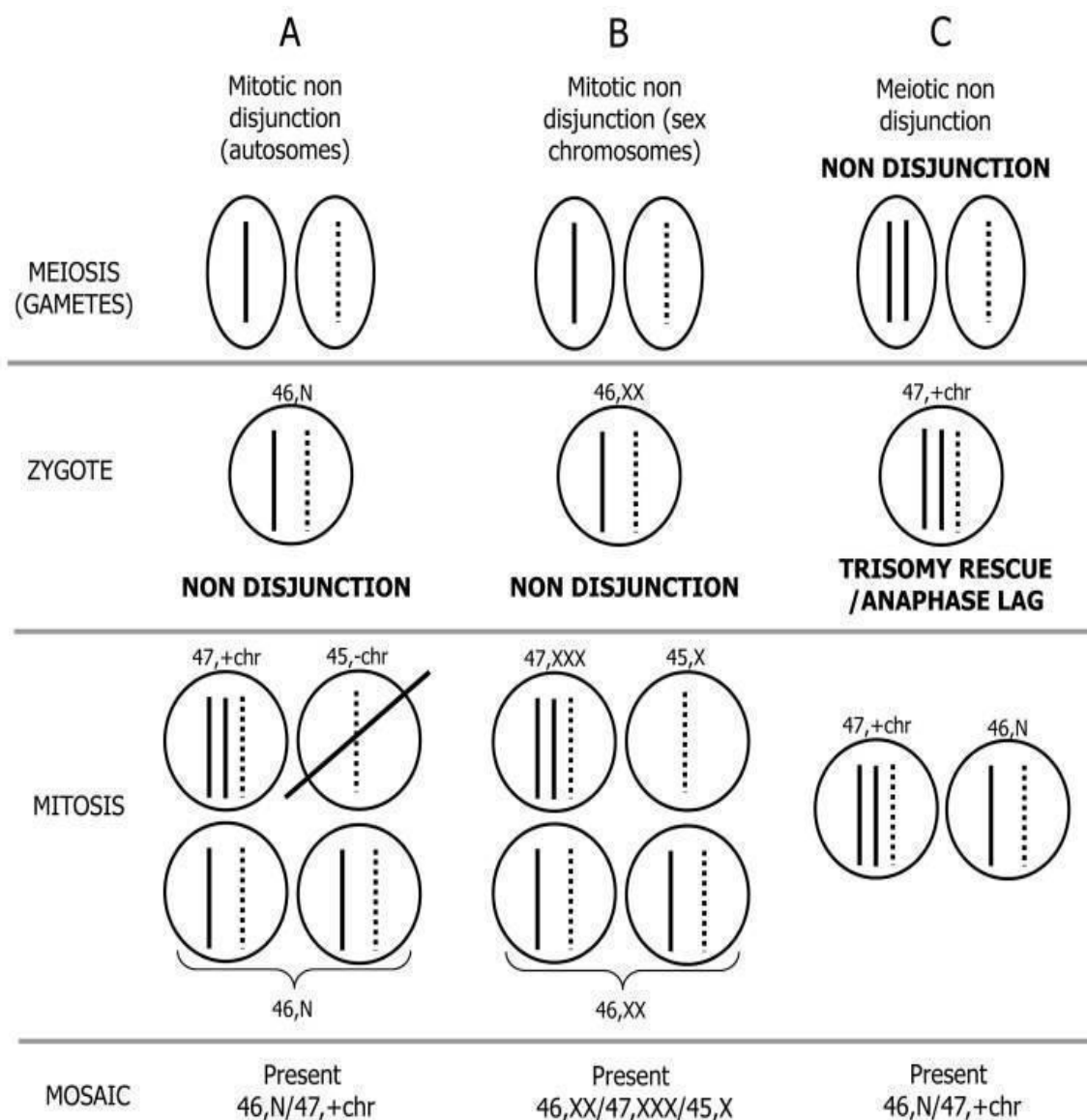
A não-disjunção meiótica pré-zigótica é oriunda de um erro na separação dos cromossomos homólogos durante a meiose I, ou da separação das cromátides-irmãs durante a fase de anáfase da meiose II do ciclo celular, que pode ser seguido de outros dois mecanismos, o atraso anafásico ou o resgate trissômico (Figura 6B) (Conlin *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015).

O atraso anafásico do ciclo celular, é um mecanismo que ocorre quando uma única cromátide é incorporada ao núcleo. Isso resulta na monossomia de determinado cromossomo naquela célula e, conseqüentemente, uma dissomia do mesmo cromossomo em uma outra célula. Este mecanismo pode ocorrer devido a uma falha em uma das cromátides-irmãs ao se fixar às fibras do fuso ou, também, quando está cromátide-irmã se liga às fibras do fuso, porém não é incorporada ao núcleo. Caso uma célula apresente uma trissomia, o processo de atraso anafásico poderá “corrigir” esta trissomia por meio do mecanismo conhecido como resgate trissômico, revertendo o cromossomo recíproco de volta à dissomia (Figura 6C) (Coonen *et al.*, 2004; Capalbo *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015).

O mecanismo de resgate trissômico é consequência de um erro de não-disjunção cromossômica, onde há a monossomia de um cromossomo em uma das células e em outra há uma trissomia de um cromossomo. Nesta célula em que há três cópias de determinado cromossomo, uma dessas é “eliminada” levando conseqüentemente a uma dissomia uniparental (UPD – do inglês, *Uniparental Disomy*) (Figura 6C). (Coonen *et al.*, 2004; Capalbo *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015).

Dissomia uniparental é um evento em que há duas cópias de um alelo da mesma origem parental (materna ou paterna). Temos a heterodissomia uniparental, que é quando alelos distintos de um mesmo pai é herdado. E ainda, temos a isodissomia uniparental, que é quando as duas cópias idênticas de um alelo do mesmo pai são herdadas (Eggermann, Soellner e Kotzot, 2015; Sazhenova e Lebedev, 2019; Thorpe *et al.*, 2020).

Os eventos de UPD estão diretamente ligados ao *imprinting* genômico, e recentemente vem sendo considerados relevantes para o estudo de alterações genômicas em mosaico, conhecido por mosaicismo epigenômico.



**Figura 6** - Representação esquemática dos mecanismos que levam ao mosaicismo cromossômico. (A) Não-disjunção cromossômica mitótica, sendo chamado de mosaicismo pós-zigótico, podendo envolver os cromossomos autossomos (A) ou, os cromossomos sexuais (B). (C) Não-disjunção meiótica pré-zigótica oriunda de um erro na separação dos cromossomos homólogos durante a meiose I, ou da separação das cromátides-irmãs durante a fase de anáfase da meiose II do ciclo celular, seguido por um resgate trissômico ou por um atraso anafásico (Grati, 2014).

### 1.2.2 Mosaicismo epigenômico

As células somáticas de organismos diplóides de mamíferos possuem duas cópias parentais dos genes. Isso fornece aos loci paternos e maternos o potencial de serem igualmente ativos no genoma da prole. O *imprinting* genômico é um fenômeno que viola esta expressão bialélica de genes paternos



e maternos, levando a sua expressão monoalélica e haploidização (Sazhenova e Lebedev, 2019; Thorpe *et al.*, 2020).

Até o presente momento, mais de 100 genes imprintados já foram identificados em mamíferos. Estes são, principalmente, genes codificadores de proteínas que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário normal, influenciando os níveis de expressão dos genes que controlam o crescimento fetal, proliferação e diferenciação celular e, outros processos relacionados ao desenvolvimento fetal, a formação da placenta, do sistema nervoso central e do metabolismo (Eggermann, Soellner e Kotzot, 2015; Sazhenova e Lebedev, 2019; Thorpe *et al.*, 2020).

O mosaicism epigenômico, como qualquer forma de mosaicism genômico, pode ser definido como a presença de diferentes epigenótipos em um único zigoto. No entanto, ao contrário do mosaicism estrutural de mutações genéticas somáticas ou anormalidade cromossômicas, o mosaicism epigenômico é bastante difícil e diferenciado do polimorfismo epigenético normal, no qual diferentes células do corpo, mesmo dentro de um mesmo tecido, tem características epigenéticas específicas (Sazhenova e Lebedev, 2019).

O possível valor patogênico do mosaicism epigenômico (ou epimosaicism) implica na existência de uma fronteira entre a variabilidade epigenética normal e patológica, situação que as novas tecnologias de investigação diagnóstica estão pouco a pouco desvendando (Eggermann, Soellner e Kotzot, 2015; Sazhenova e Lebedev, 2019; Thorpe *et al.*, 2020).

### 1.2.3 Mosaicism genômico

O mosaicism genômico é aquele que engloba pequenas alterações a nível da dupla fita de DNA. São elas, SNVs (do inglês, ***Single Nucleotide Variants***), InDels: inserções e deleções de nucleotídeos na fita do DNA (do inglês, ***INsertions and Deletions***), e CNVs (do inglês, ***Copy Number Variation***), sendo esta última a mais relatada na literatura sob a condição de mosaico (Campbell *et al.*, 2015; Gajecka, 2016; Cao *et al.*, 2019; Martínez-Glez *et al.*, 2020).

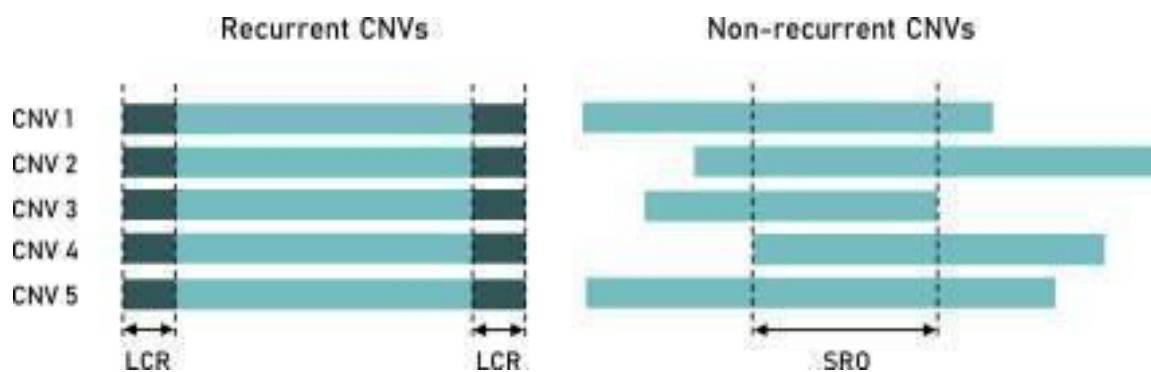
Os SNVs são uma variação em uma única posição na sequência de DNA entre os indivíduos. Essas variações genéticas ocorrem em 1 a cada 1000 bases no genoma humano, e quando presentes em pelo menos 1% da população

mundial são denominadas de SNPs (do inglês, **Single Nucleotide Polymorphisms**). Segundo a literatura, grande parte dos SNPs não tem efeito sobre o fenótipo, porém quando estes ocorrem dentro de um gene ou em uma região reguladora próxima ao gene pode afetar a função do mesmo, sendo assim as SNVs (Cao *et al.*, 2019; Martínez-Glez *et al.*, 2020).

As InDels são pequenas inserções e deleções de nucleotídeos na fita do DNA que variam de 1 a 10.000 pb de comprimento, considerada a segunda classe mais comum de mutação no genoma humano. Porém, podem influenciar no fenótipo clínico quando alteram a função da proteína final (Macé, Kutalik e Valsesia, 2018 Pös *et al.*, 2021).

As CNVs são definidas por variações no número de cópias (deleções e/ou duplicações) presentes no genoma humano que variam de aproximadamente 50 pb a muitos megabases de extensão. Sua frequência pode variar dependendo do tamanho da alteração, mas, estimativas sugerem que mais de 12% do genoma de qualquer indivíduo pode apresentar alterações em número de cópias, ou seja, indivíduos normais e saudáveis também podem ser portadores de CNVs, porém, estas não causam fenótipo clínico (Redon *et al.*, 2006; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Macé, Kutalik e Valsesia, 2018 Pös *et al.*, 2021).

É possível classificar as CNVs em dois grandes grupos, recorrentes e não-recorrentes, que vão variar em relação ao seu mecanismo gerador (Figura 7). CNVs “recorrentes” são mediadas por sequências LCRs (do inglês, **Low Copy Repeats**) que variam entre 1 e 5 kb e possuem mais de 95% de similaridade. Já as CNVs “não-recorrentes” são caracterizadas pela microhomologia e por apresentar “blunt ends” ou pequenas inserções nas junções dos pontos de quebra (Macé, Kutalik e Valsesia, 2018; Pös *et al.*, 2021).



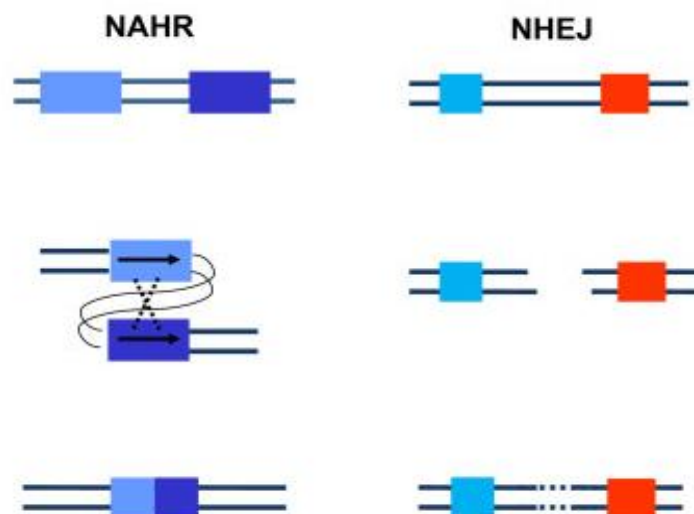
**Figura 7** - CNVs recorrentes e CNVs não recorrentes. As CNVs recorrentes apresentam o mesmo tamanho e são mediadas por LCRs. Já as CNVs não recorrentes podem ter tamanhos distintos e compartilhar uma pequena região de sobreposição (Pös et al., 2021).

Um dos principais mecanismos de CNVs “recorrentes” é a recombinação homóloga não-alélica (do inglês, *Non-Allelic Homologous Recombination* - NAHR) que devido à alta similaridade das LCRs, essas sequências podem acabar se alinhando indevidamente durante a divisão celular, mitótica ou meiótica. Esse alinhamento pode ocorrer entre cromossomos homólogos ou não ou entre diferentes *locis* do mesmo cromossomo. Este alinhamento indevido pode resultar em rearranjos genômicos, como deleções, duplicações e inversões, e até em translocações quando as LCRs estiverem localizadas em cromossomos distintos (Figura 8) (Gu, Zhang e Lupski, 2008; Pös et al., 2021; Burssed et al., 2022).

Já dentro os mecanismos de CNVs “não-recorrentes” temos a junção das extremidades não-homólogas (do inglês, *Non-Homologous end Joining* - NHEJ), que ocorre quando há uma quebra na dupla fita de DNA sucedido de um reparo pela ligação de ambas as extremidades. Como este reparo não necessita de presença de um molde homólogo, conseqüentemente pode-se observar a presença de pequenas InDels, entre 1-34 pb, no ponto de quebra da CNV. Este tipo de mecanismo pode ocorrer frequentemente em regiões repetitivas do DNA, devido ser uma região mais suscetível à quebra da dupla fita, gerando uma instabilidade genômica (Figura 8) (Pös et al., 2021; Burssed et al., 2022).

Temos também a junção de extremidades mediada por micro homologia (do inglês, *Microhomology-mediated end Joining* - MEEJ), que se utiliza da excisão de bases expondo regiões de alta micro homologia dentro da dupla fita para o anelamento e posterior junção das extremidades, gerando assim deleções e translocações nas fitas envolvidas (Pös et al., 2021; Burssed et al.,

2022). Ambos os mecanismos, NHEJ e MMEJ, por serem decorrentes de uma quebra na dupla fita de DNA e a junção das mesmas posteriormente.



**Figura 8** – Exemplificação de mecanismos que originam as variações no número de cópias: a esquerda da imagem temos NAHR, onde os blocos em azul representam LCRs que se alinham de forma errônea devido à alta similaridade entre elas, resultando em rearranjos que podem levar a deleções ou duplicações destes segmentos. E a direita da imagem temos o NHEJ, onde há uma quebra da dupla fita entre duas sequências não homólogas, e por meio do NHEJ acaba realizando a junção de ambas as extremidades, ocasionando na deleção do segmento entre ambas as regiões (Gu, Zhang e Lupski, 2008).

Segundo Vanneste e colaboradores (2009), em aproximadamente 70% dos embriões humanos foi visualizada a presença CNVs em pelo menos um blastômero durante a primeira semana do desenvolvimento embrionário. Estas CNVs são geradas pois, o processo de transcrição do DNA não está totalmente ativado em humanos até o estágio de clivagem do zigoto, constituído por oito células. Sendo assim, a falta de replicação, verificação e reparo de erros presentes na maquinaria do DNA podem resultar em um aumento da instabilidade genômica, deixando o material genético mais propenso a alterações neste estágio do desenvolvimento embrionário, podendo levar assim ao mosaïcismo genômico (Campbell *et al.*, 2015).

Estudos anteriormente realizados relataram algumas doenças em que CNVs foram descritas sob a forma de mosaico, como na Síndrome de Rett, uma anormalidade associada ao cromossomo X, relacionada a alterações no gene *MECP2*. Essa síndrome é letal para homens quando presente em todas as

células, porém, essa letalidade não é necessariamente observada no caso de mosaicismo (Zhang *et al.*, 2019; Cooley Coleman *et al.*, 2022). Este fato ressalta a importância de se constatar o mosaicismo genômico, uma vez que há poucos relatos na literatura sobre alterações submicroscópicas na forma de mosaico. E, embora avanços na tecnologia de genotipagem e sequenciamento tenham acelerado a taxa de descoberta dessas anormalidades, a maioria dos casos dessas alterações em mosaico permanecem indetectáveis.

### 1.3 Investigação de mosaicismo pela citogenômica

Alterações cromossômicas e/ou genômicas sob a forma de mosaicismo podem ser estudadas por diferentes técnicas citogenômicas, podendo ser elas, o cariótipo por bandamento G, Hibridação *in situ* Fluorescente - FISH (do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization*), MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e o array genômico.

Contudo, a resolução do cariótipo é limitada a alterações de no mínimo 5 Mb. Além disso, o mosaicismo de baixo percentual é de difícil caracterização pela cariotipagem clássica, exigindo a ampliação do número de células analisadas. Rotineiramente, este estudo é realizado em culturas linfocitárias obtidas a partir de sangue periférico (de origem mesodérmica), devido a este ser um exame pouco invasivo cujas células apresentam rápida divisão celular. No entanto, nos casos em que há suspeita de mosaicismo, faz-se necessário a cariotipagem em outro tipo celular, como os fibroblastos (de origem ectodérmica) cultivados por meio de biópsia de pele, sendo este um procedimento invasivo e que exige um maior tempo de cultura celular, além de ser mais suscetível a contaminação (Sdano *et al.*, 2014). Nesse sentido, a análise de células obtidas de raspado do epitélio bucal (também de origem ectodérmica) é uma alternativa para a detecção do mosaicismo, uma vez que a coleta dessas células é realizada por métodos simples e não invasivos, podendo assim futuramente substituir a realização da biópsia de pele. No entanto, em geral, são realizados apenas testes moleculares neste tipo de amostra devido à dificuldade na obtenção de crescimento celular e de cromossomos viáveis para o estudo citogenético.

Uma técnica de citogenética molecular amplamente utilizada é o *array* genômico, pois possui maior resolução do que as técnicas descritas

anteriormente (cerca de 0,7 kb), permitindo a detecção de mosaicismos que envolvam alterações menores que 50 kb, junto da análise de milhares de alvos genômicos ao mesmo tempo (Campbell *et al.*, 2015).

Esta metodologia utiliza da hibridação por complementaridade do DNA proveniente de diversas amostras biológicas às sondas (segmentos de sequência genômica) contidas na lâmina ou chips de *array*, e assim é realizada a análise da emissão de fluorescência das sequências pesquisadas por meio de *softwares* específicos de análise. Dessa forma, a técnica de *array* realiza um escaneamento completo e geral do genoma, sendo capaz de detectar e avaliar alterações como microduplicações/microdeleções, mapear a localização genômica dos pontos de quebra destas alterações, compreender mecanismos de formação de rearranjos e, determinar a patogenicidade das alterações (Manning e Hudgins, 2010).

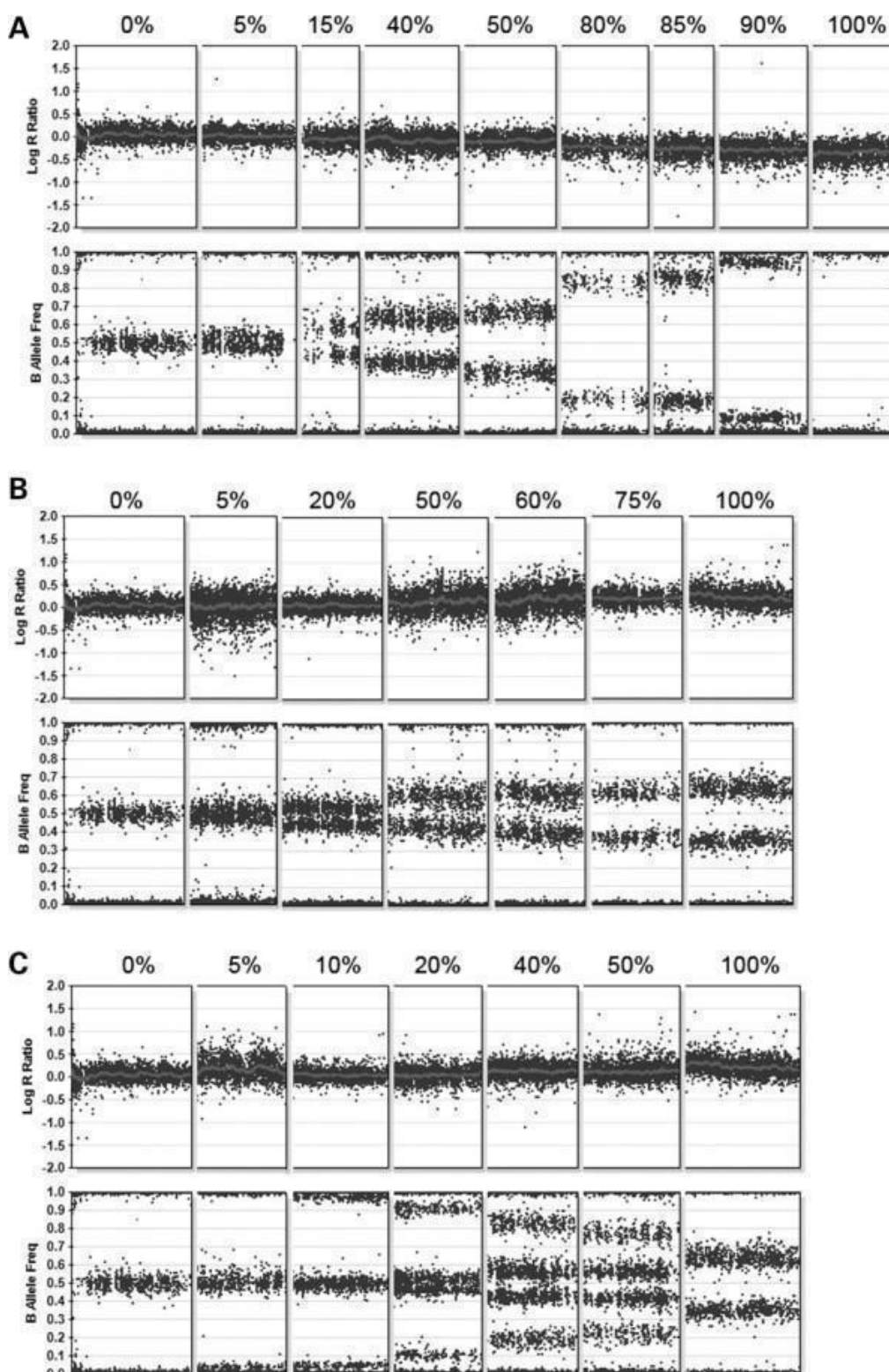
Esta é uma técnica amplamente utilizada para diagnóstico de pacientes com DI e múltiplas anomalias congênitas que não possuem uma suspeita clínica definida. Este possui a capacidade de identificar em um único teste ganhos e perdas de regiões genômicas que podem estar relacionadas com o fenótipo do paciente, também sendo capaz de identificar mosaicismos acima de 30%, aneuploidias, dissomia uniparental e regiões de homozigosidade (ROH, do inglês ***Regions Of Homozygosity***) (Manning e Hudgins, 2010; Sund e Rehder, 2014; Eggermann *et al.*, 2015).

No cenário atual, há diversas plataformas baseadas na tecnologia dos *arrays* disponibilizadas por diferentes empresas, e essas apresentam diferentes densidades e cobertura do genoma, sendo que, algumas dessas plataformas podem interrogar milhões de regiões em uma única vez. Uma das plataformas dos *array* muito utilizadas são os CGH-*array* (*array* por hibridação genômica comparativa, do inglês ***Comparative Genomic Hybridization***) e os SNP-*arrays* (Emanuel e Saitta, 2007; Edelman e Hischhoern, 2009; Alkan *et al.*, 2011).

Os SNP-*arrays* possuem sondas desenhadas para identificar a diferença de um único nucleotídeo nas sequências de DNA, permitindo assim a aproximação do ponto de quebra das alterações, além de identificar baixos níveis de mosaicismos. Dessa forma, esta plataforma tem a capacidade de detectar alterações de número de cópias em grandes regiões do genoma, além de genotipar os indivíduos em locais precisos, podendo ser útil na detecção de

eventos somáticos de baixo nível, como o mosaicismo. Esta é, então, uma ferramenta valiosa, pois permite a integração de informações de genótipos e números de cópias (Emanuel e Saitta, 2007; Edelman e Hirschhorn, 2009; Alkan *et al.*, 2011).

Em um único estudo descrito na literatura, foi possível verificar que o SNP-*array* é uma técnica mais sensível que o CGH-*array*, mostrando-se capaz de detectar níveis de mosaicismo de até no mínimo 5%, além de analisar a zigosidade dos SNP (ROH e UPD) (Figura 9). Isso possibilita analisar o mecanismo genético pelo qual o mosaicismo ocorreu por meio de um cálculo métrico denominado frequência do alelo B (BAF, do inglês **B Allele Frequency**) (Conlin *et al.*, 2010; Biesecker e Spineer, 2013).



**Figura 9** – Representação da detecção de distintos níveis de mosaicism genético dentro de um único tecido celular (sangue periférico). (A) Níveis de mosaicism para deleções envolvendo os cromossomos autossomos. (B) Níveis de mosaicism para trissomias. O padrão de frequência do alelo B indica que os mesmos dois haplótipos presentes na linha celular euplóide também estão presentes na linha celular triploide em proporções alteradas. (C) Níveis variados de mosaicism para trissomias. As frequências adicionais do alelo B nos pacientes com mosaico representam genótipos presentes na linha celular trissômica que não estão presentes na linha celular euplóide, sugerindo uma origem meiótica da trissomia (Conlin *et al.*, 2010).



Alguma das vantagens da realização da técnica de array para detecção de mosaicismos é de que muitas células são analisadas simultaneamente e essas são analisadas em todas as fases do ciclo celular, incluindo intérfase e metáfase, reduzindo assim o viés de cultivo celular, pois as amostras não requerem cultura celular (Biesecker e Spinner, 2013; Conlin *et al.*, 2010).

Atualmente, há disponíveis ferramentas de bioinformática para a análise e detecção de mosaicismos. Estas, na sua grande maioria, se utilizam de algoritmos que interpretam uma divisão de genótipos que estão em desequilíbrio alélico e sugerem uma duplicação genômica. No entanto, esta duplicação só será real quando for comparada com um “ganho” de intensidade de sinais obtidos pela leitura das sondas do SNP-array, senão teremos um resultado falso-positivo, onde a duplicação na realidade é uma deleção em mosaico (Biesecker e Spinner, 2013; Conlin *et al.*, 2010).

Desta forma, o mosaicismos é frequentemente analisado de forma errônea na rotina diagnóstica. Além de que, nem sempre o tecido em que a alteração estiver presente está sendo estudado. Assim, utilizamos neste trabalho as ferramentas de análise disponibilizadas pela plataforma Illumina em conjunto com os bancos de dados públicos, criando assim um fluxo que foi desenvolvido especificamente para este estudo em questão com o intuito de auxiliar no diagnóstico de alterações genômicas sob a condição de mosaicismos, estejam elas presentes intra ou intertecidual.

Nesse sentido, a detecção de alterações genômicas em diferentes tecidos utilizando as técnicas citogenômicas pode auxiliar na compreensão das alterações genômicas sob a forma de mosaicismos (intra e/ou intertecidual) associado a manifestações clínicas, bem como correlacionar a alteração em mosaico encontrada em ambos os tecidos de origem ectodérmica (fibroblastos e mucosa oral).

Esse tipo de investigação pode revelar elementos importantes para o entendimento da relação entre a arquitetura genômica e seu efeito fenotípico.

# Objetivos

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- ✓ Detectar a presença de alterações citogenômicas na condição de mosaico e avaliar sua influência sob o fenótipo clínico em pacientes com manchas cutâneas pigmentares e deficiência intelectual idiopática

### 2.2 Objetivos secundários

- ✓ Realizar o estudo citogenético por bandamento G em sangue periférico e fibroblastos.
- ✓ Realizar o teste de *array* em DNA extraído de células provenientes de mucosa oral.
- ✓ Determinar a influência exercida pelo mosaicismo sob o fenótipo clínico.
- ✓ Avaliar e correlacionar os possíveis mecanismos responsáveis pelas alterações observadas.
- ✓ Estimar a frequência de mosaicismo para alterações citogenômicas entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do ICr-HCMFUSP.

---

# Métodos

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, cuja casuística foi composta por 21 conjuntos de amostras referentes a 21 pacientes (14 do sexo feminino e sete do sexo masculino) com ADG e/ou DI e manchas cutâneas pigmentares sem estudo citogenético e molecular anterior, ou, cujo estudo foi incompleto ou insuficiente para a identificação de alteração genômica. Cada conjunto de amostras foi composto por uma amostra de sangue periférico colhido em tubo contendo heparina sódica, uma amostra de sangue periférico colhido em tubo contendo EDTA, uma amostra de fragmento de pele e uma amostra de raspado de epitélio bucal de mucosa oral.

Os pacientes selecionados são atendidos periodicamente no Ambulatório de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HCFMUSP), sob a supervisão da Dra. Chong Ae Kim, e foram clinicamente avaliados pelos médicos geneticistas.

A avaliação clínica foi composta por anamnese detalhada contendo: dados de história clínica e evolutiva, desenvolvimento neuropsicomotor, antecedentes gineco-obstétricos maternos, histórico familiar, heredograma e exames complementares pré e pós-natais. Bem como, exame físico e registro fotográfico.

Foram incluídos pacientes com manchas cutâneas pigmentares associadas ao ADG e/ou DI que não possuem um diagnóstico conclusivo para o quadro clínico, com ou sem resultado prévio de cariótipo de sangue periférico. Foram excluídos deste estudo pacientes que não possuíam manchas cutâneas pigmentares associadas ao ADG e/ou DI.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cappesq – 3.076.781) (Anexo A). Os pacientes e/ou seus responsáveis legais consentiram e assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

Acrescento, que este estudo teve o apoio financeiro FAPESP (Processo nº 2018/20936-4).

## 3.2 Métodos

Conforme supracitado, para cada paciente foram coletadas quatro amostras biológicas provenientes de tecidos distintos para realização de diferentes testes genéticos, sendo:

- 4 mL de sangue periférico em tubo contendo heparina sódica (tubo de tampa verde) para o estudo citogenético por bandamento G;
- 4 mL de sangue periférico em um tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA – tubo de tampa roxa) destinado a extração de DNA para realização do estudo por *array*;
- Um fragmento de 4 mm de pele de região contendo mancha cutânea pigmentar utilizado para estudo citogenético por bandamento G, e extração de DNA para realização do estudo por *array*;
- Raspado de epitélio bucal para a obtenção de células da mucosa oral com auxílio do kit de coleta *ORACollect for Pediatric*<sup>®</sup> (OC-175) (DNA Genotek<sup>®</sup>) também destinadas a extração de DNA e estudo citogenômico por *array*.

Todos os experimentos foram feitos no Laboratório de Citogenômica (LIM 03) da rede PREMIUM da FMUSP.

### 3.2.1 Cultura de linfócitos obtidos a partir de sangue periférico

A cultura de linfócitos foi realizada conforme o protocolo já padronizado pelo Laboratório de Citogenômica do LIM 03. As amostras foram processadas imediatamente após a coleta.

Em um fluxo laminar estéril, aproximadamente 0,5 mL (13 gotas) de sangue periférico foram transferidos para um tubo estéril do tipo *Falcon* de 15 mL (Corning<sup>®</sup>) contendo 5 mL de meio de cultura *PB-MAX<sup>TM</sup> Karyotyping Medium* (Gibco<sup>®</sup>), com auxílio de uma pipeta *Pauster* estéril. As culturas foram incubadas, em posição inclinada, em estufa com CO<sub>2</sub> (5%) à 37°C por aproximadamente 72 horas.

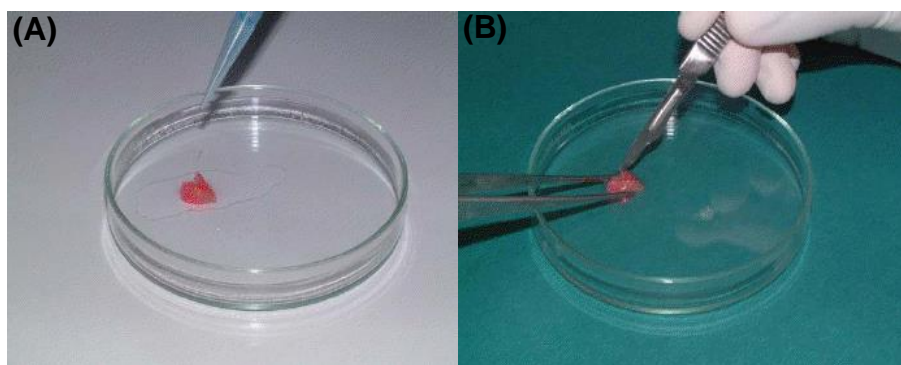
Após o período de incubação, foram adicionados 65 µL de colchicina (Colcemid KaryoMAX - Gibco<sup>®</sup>) às culturas e essas foram novamente incubadas

em com CO<sub>2</sub> (5%) à 37°C por mais uma hora. O material cultivado foi submetido à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta *Pauster* estéril, o sobrenadante foi desprezado e ao pellet foram adicionados 8 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M) aquecida a 37°C. Os frascos de cultura foram novamente incubados em estufa à 37°C por 15 minutos e em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução fixadora (3 mL de metanol: 1 mL de ácido acético glacial) gelada (~20°C), com o intuito de interromper a hipotonia. Posteriormente, o tubo foi centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e ao pellet foram adicionados 6 mL de solução fixadora, homogeneizando por pipetagem. Esse processo foi repetido por três vezes.

O material obtido a partir da cultura celular foi armazenado em geladeira e conservado em 2 mL de solução fixadora para a confecção das lâminas coloração por bandamento G.

### 3.2.2 Cultura de fibroblastos a partir de biópsia cutânea

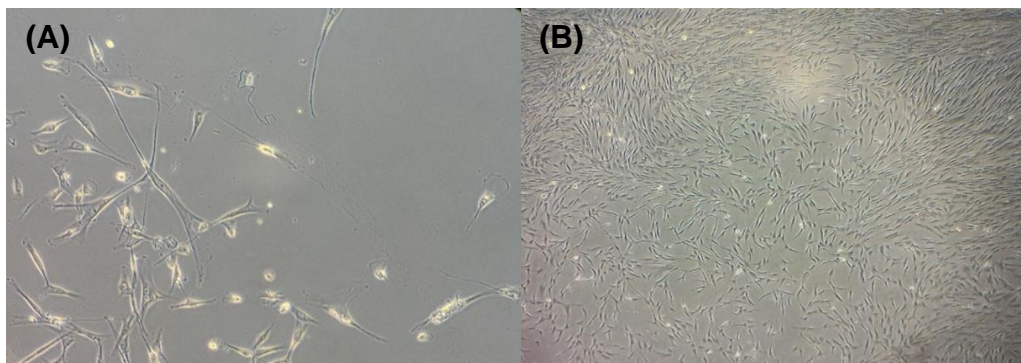
Em um fluxo laminar estéril, o fragmento de pele que foi coletado de cada paciente foi transferido para uma placa de *Petri*, onde foi lavado com meio de cultura Amniomax (Gibco®). Em seguida, o fragmento foi cortado em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi e pinça cirúrgica (Figura 10).



**Figura 10 – (A)** Lavagem do tecido; **(B)** Fragmentação (corte) do tecido (Foto: Laboratório de Citogenômica).

Utilizando a ponta de uma pipeta *Pauster* estéril, os fragmentos foram colocados em contato com a superfície interna de duas garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning®) contendo 4 mL de meio Amniomax (Gibco®) suplementado com

1 mL de suplemento Amniomax (Gibco®) e 0,25 µL de penicilina/streptomicina (Gibco®). As culturas foram então incubadas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por sete dias. Após esse período, com o auxílio de microscópio invertido, foi observada a confluência celular. No caso de pouca proliferação, foi realizada apenas a troca do meio de cultura e as culturas voltaram para a estufa. Esse procedimento foi repetido até a completa proliferação celular (Figura 11).



**Figura 11 – (A)** Cultura de fibroblasto em crescimento; **(B)** Cultura de fibroblastos com boa confluência (Foto: Laboratório de Citogenômica).

Ao atingirem o ponto ideal de confluência, as garrafas foram destinadas ao estudo citogenético por bandamento G. Para tanto, foi adicionado às culturas 420 µL de colchicina (Colcemid KaryoMAX - Gibco®) e essas foram novamente incubadas em com CO<sub>2</sub> (5%) à 37°C por mais quatro horas. Após esse período, todo o conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo *Falcon* de 50 mL (Corning®). As culturas foram então lavadas com soro fisiológico à 0,9% por três vezes, sendo que o conteúdo lavado foi adicionado ao mesmo tubo. Após, as culturas foram tratadas com tripsina EDTA (Gibco®) para soltar as células que estão aderidas ao frasco de cultura. Esse material foi adicionado ao mesmo tubo Falcon contendo o meio de cultura, e esse mesmo tubo foi submetido a centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 8 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) aquecida à 97°C, o material foi novamente incubado em estufa à 37°C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de solução fixadora (3 mL de metanol: 1 mL de ácido acético glacial) gelada (~20°C), com o intuito de interromper a hipotonia. Posteriormente, o tubo foi centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e ao pellet



foram adicionados 6 mL de solução fixadora, homogeneizando por pipetagem. Esse processo foi repetido por três vezes.

O material obtido a partir da cultura celular foi armazenado em geladeira e conservado em 2 mL de solução fixadora para a confecção das lâminas e a coloração por bandamento G.

### 3.2.3 Estudo citogenético por bandamento G

Para o estudo citogenético por bandamento G das amostras de sangue periférico e fibroblastos processadas anteriormente, foi-se necessário a confecção das lâminas. Essas foram previamente lavadas com sabão *Extran* (Merk®) e água destilada. Em posição inclinada, sob um suporte em Banho Maria à 65°C, foi pingado 100 µL da amostra com solução fixadora, aos poucos, na lâmina a uma distância de aproximadamente 30 cm. Após secarem, as lâminas foram observadas em microscópio óptico em fase para verificação das culturas e crescimento celular.

As lâminas foram envelhecidas na estufa à 90°C, por 4 minutos. Após, receberam o tratamento com solução de tripsina (1g de tripsina 1:250) (Gibco®) diluída em 100 mL de tampão dulbeco e em seguida coradas com solução de corante Giemsa (Merk®) à 4% por 6 minutos, enxaguadas em água corrente e secas em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas no microscópio óptico *AxioVision Zeiss®* e as imagens registradas pelo sistema de captura *Metasystem® Ikaros*. Para cada paciente foram analisadas 50 metáfases sob bandamento G. As variações genômicas foram classificadas e descritas conforme a terminologia do ISCN (do inglês, *International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) (ISCN, 2020).

### 3.2.4 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico das amostras de: (1) sangue periférico, partindo da coleta de 4 mL de sangue periférico em tubo EDTA e, (2) da mucosa oral, partindo da coleta de raspado bucal com auxílio do kit de coleta *ORACollect for Pediatric®* (OC-175) (DNA Genotek®), foi-se utilizado o kit de extração

QIAmp® DNA Blood Mini Kit (250r) (QIAGEN®), segundo o protocolo do fabricante com algumas modificações.

Para as amostras de fibroblastos obtidos a partir da biópsia de pele, foi utilizado o kit QIAmp® DNA Tissue Kit (50r) (QIAGEN®), segundo o protocolo do fabricante com algumas modificações.

### 3.2.5 Integridade e quantificação das amostras de DNA

A integridade de todas as amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo a corrida realizada a 100V por 1 hora, sendo consideradas adequadas para a técnica de *array* genômico as amostras sem fragmentação e sem bandas inespecíficas na corrida do gel.

A concentração das amostras de DNA foi avaliada por meio do fluorímetro Qubit® (Invitrogen®), que se baseia na detecção de fluorescência emitida quando há ligação entre o reagente do *kit* com o alvo-específico, neste caso, o DNA, garantindo uma maior precisão e acurácia na quantificação da concentração final das amostras utilizadas.

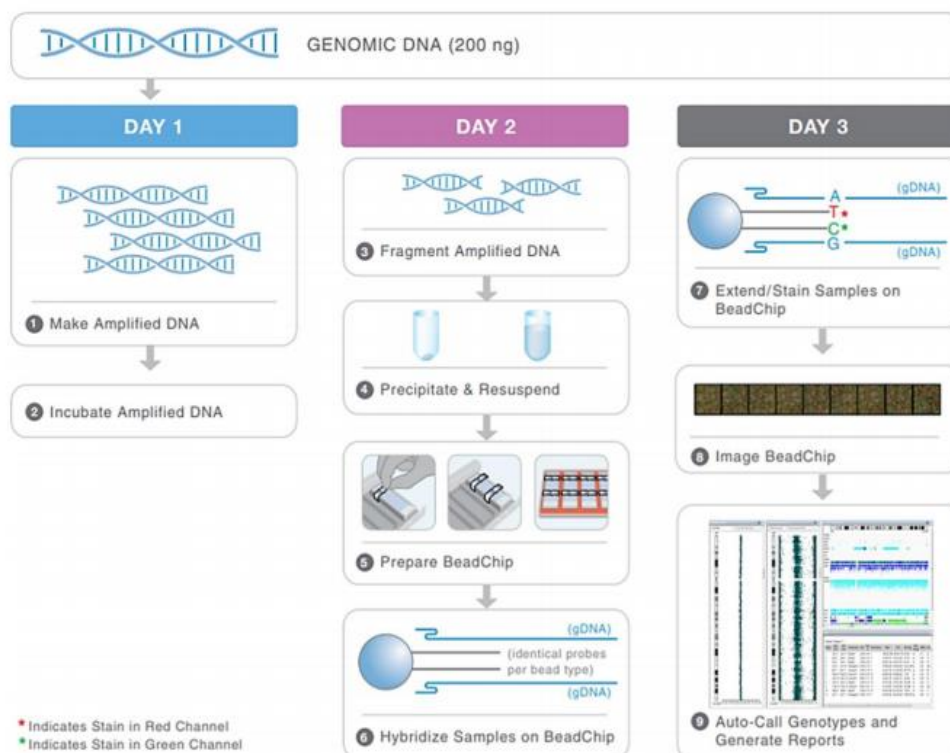
### 3.2.6 Triagem genômica por *array*

A técnica de *bead array* foi realizada na plataforma do fabricante Illumina®, utilizando o chip *Infinium CytoSPN-850K BeadChip*® (Illumina®), disponível no Laboratório de Citogenômica da Rede PREMIUM da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O *beadchip* utilizado compreende um painel de triagem do genoma e contém aproximadamente 850.000 sondas de oligonucleotídeos de 50-*mers*, com um espaçamento médio de 1,8 kb entre elas e a resolução de regiões alvo apresenta uma distância média de 10 kb. Dentre essas sondas, há cobertura enriquecida para aproximadamente 3.300 genes de relevância clínica para pesquisa de alterações constitucionais e câncer.

A técnica é baseada na hibridação das *beads* magnéticas a sondas que apresentam sequências complementares para todo o genoma, com o objetivo de detectar microdeleções e microduplicações no genoma, além de regiões de homozigossidade (ROH).

Os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Figura 12), iniciando com 4  $\mu\text{L}$  de DNA a uma concentração 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , de modo que a quantidade final de amostra de utilizada fosse de 200  $\text{ng}$ .



**Figura 12** – Fluxograma da técnica de *array* da plataforma Illumina®. **FONTE:** [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/workflows/workflow\\_infinium.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/workflows/workflow_infinium.pdf).

As amostras extraídas foram transferidas para uma placa de 0,8mL recomendada pelo próprio fabricante, para que o DNA pudesse ser denaturado quimicamente e em seguida neutralizado por reagentes específicos fornecidos no *kit*. Após, foi realizada uma etapa de amplificação genômica isotérmica, por meio de incubação à 37°C por um período de 20-24 horas.

Posteriormente ao período de incubação, as amostras de DNA foram fragmentadas por meio da ação de uma enzima disponível no *kit* (reagente FMS), precipitadas e ressuspendidas em reagentes específicos para seguir com a aplicação das amostras nos *beadchips*, conforme instruções fornecidas pelo fabricante.

A placa com as amostras foi mantida invertida por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente para que o pellet pudesse secar. Em seguida, o DNA

precipitado foi ressuspenso com um reagente denominado RA1 e aplicado no *beadchip*. Este foi incubado à 48°C por aproximadamente 16 horas para que ocorresse a hibridação das amostras nas sondas específicas.

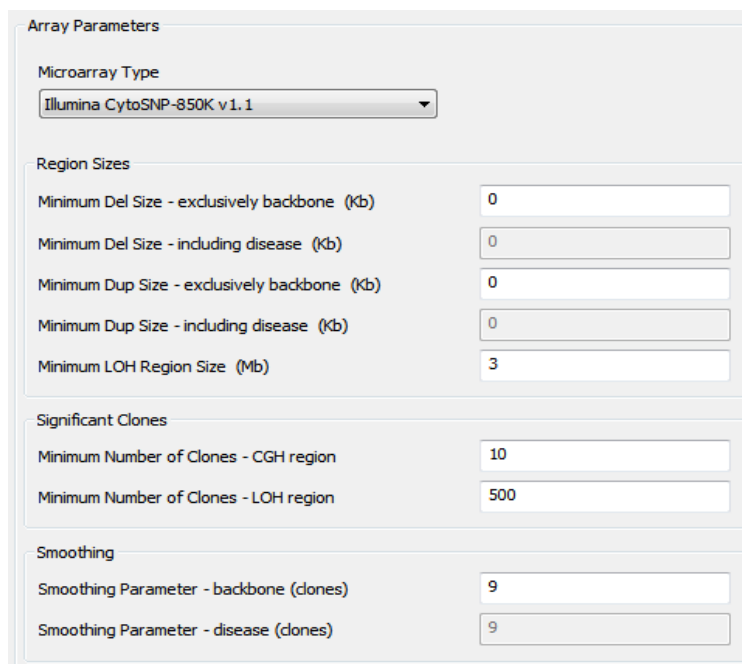
Após a etapa de hibridação, o *beadchip* foi lavado para remoção do DNA não hibridado e, então, preparado para o processo de extensão de uma única base e coloração. Os nucleotídeos (A - adenina, T - timina, C – citosina e G – guanina) foram adicionados, seguindo para a etapa de coloração dos nucleotídeos hibridados com fluorocromos específicos (A e T – marcação em vermelho; C e G – marcação em verde).

Sendo assim, seguiu-se para o último procedimento da técnica que compreendeu a leitura do *beadchip*, por meio do *scanner iScan*<sup>®</sup> (Illumina<sup>®</sup>). Esse mede a fluorescência incorporada às sondas nas regiões nas quais houve a hibridação do DNA e este foi transformado em um arquivo formato .GTC para posterior análise pelo *software* específico disponibilizado pelo próprio fabricante.

### 3.2.7 Análise dos dados

A análise dos resultados obtidos por meio da leitura dos *beadchips* no *scanner* foi realizada utilizando o *software* BlueFuse<sup>TM</sup> Multi v4.4 (Illumina<sup>®</sup>), disponibilizado pelo fabricante. Os sinais de fluorescência emitidos pelas bases estendidas e capturadas pelo *scanner* foram identificados e normalizados para os cálculos de algoritmos, com o propósito de determinar alterações no número de cópias e detectar as regiões de homozigidade (ROH).

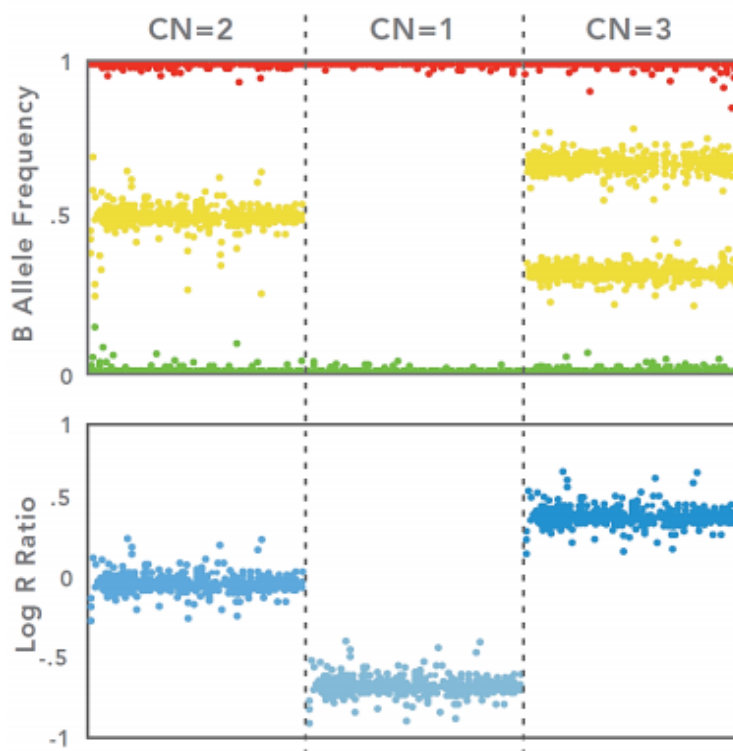
Para a identificação e determinação de uma CNV, o *software* se baseia na alteração de no mínimo dez sondas consecutivas, podendo ser deletadas ou duplicadas (considerando-se uma resolução efetiva global de ~18 kb, conforme informado pelo fabricante), sendo o *cutoff* da razão de  $\log_2$  de -0,41 para deleções e de +0,32 para duplicações. E o *software* leva em consideração de, ao menos, 500 sondas consecutivas alteradas e um tamanho mínimo de 3 Mb para acatar uma ROH (Figura 13).



Array Parameters	
Microarray Type	Illumina CytoSNP-850K v1.1
Region Sizes	
Minimum Del Size - exclusively backbone (Kb)	0
Minimum Del Size - including disease (Kb)	0
Minimum Dup Size - exclusively backbone (Kb)	0
Minimum Dup Size - including disease (Kb)	0
Minimum LOH Region Size (Mb)	3
Significant Clones	
Minimum Number of Clones - CGH region	10
Minimum Number of Clones - LOH region	500
Smoothing	
Smoothing Parameter - backbone (clones)	9
Smoothing Parameter - disease (clones)	9

**Figura 13** – Parâmetros utilizados no software *BlueFuse™ Multi v4.4* para análise das CNVs e das ROHs por meio da técnica de array.

Além destes parâmetros, o *software* utiliza os gráficos *B Allele Frequency* ( $pR$ ). Os gráficos de BAF representam a frequência alélica e seus valores pode variar entre 0 a 1, sendo que regiões normais ( $2n$ ) apresentam as sondas distribuídas entre 0, 0,5 e 1, regiões de homoziguidade em 0 e 1, e as regiões com alterações alélicas apresentavam valores intermediários (duplicações – valores das sondas em 0, 0,25, 0,75 e 1; deleções – valores das sondas em 0 e 1). Já os gráficos de LRR representam o número de cópias genômicas presentes, sendo que valores em 0 representam duas cópias ( $2n$ ), valores menores representam uma cópia ( $n$ ) e maiores três cópias ( $3n$ ) (Figura 14) (LaFramboise, 2009).



**Figura 14** – Exemplos de resultados obtidos por meio da técnica de array, segundo a representação gráfica dada pelo *software* BlueFuse™ Multi v4.4. CN = 2 refere-se ao resultado normal (duas cópias do genoma), CN = 1 representa uma deleção (uma cópia do genoma), e CN=3 representa uma duplicação (três cópias do genoma). **FONTE:** [https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_cytogenetics.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_cytogenetics.pdf)

Todas as CNVs obtidas foram checadas para que fosse obtida apenas as alterações verdadeiras. Posteriormente, essas foram avaliadas e classificadas com auxílio dos bancos de dados online disponíveis para consultas.

As posições genômicas das alterações foram obtidas de acordo com o genoma de referência GRCh97/hg19.

### 3.2.8 Interpretação e classificação das CNVs

As CNVs identificadas foram classificadas seguindo os critérios preconizados pelo ACMG (do inglês, *American College of Medical Genetics and Genomics*) em cinco principais grupos:

- Benigna e provavelmente benigna: alterações observadas em amostras de indivíduos normais sem fenótipo clínico, catalogadas nos bancos de dados populacionais (como o DGV) e classificadas como polimórficas dentro de uma população;

- VUS (do inglês, *Variants of Uncertain clinical Significance*): alterações que não possuem informações relevantes o suficiente, disponíveis nos bancos de dados, para serem classificadas como causadoras do fenótipo clínico;

- Provavelmente patogênica e patogênica: alterações genômicas relatadas na literatura médica e que englobam genes associados ao fenótipo clínico observado.

Os aspectos mais relevantes para a classificação incluem: o conteúdo genômico, a sensibilidade à dosagem da região ou do gene, efeito funcional previsto, sobreposição clínica com pacientes relatados nos bancos de dados e literatura, evidências de casos e controle dentro dos bancos de dados e o padrão de herança (Riggs *et al.*, 2020).

A interpretação das CNVs obtidas consistiu então, na avaliação conjunta das informações relevantes citadas acima, do fenótipo clínico do paciente juntamente das informações dos bancos de dados disponíveis *online*. Os bancos consultados foram:

- *Database of Genomic Variants* (DGV) – disponível em: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

- *The Clinical Genome Resource* (ClinGen) – disponível em: <https://clinicalgenome.org/>

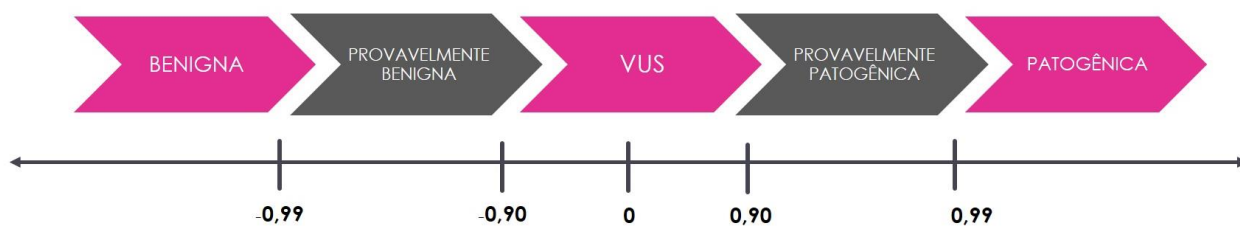
- *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER) – disponível em: <https://www.deciphergenomics.org/>

- *UCSC Genome Browsers* – disponível em: <https://genome.ucsc.edu/>

- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) – disponível em: <https://www.omim.org/>

Para auxiliar nesta análise, foi utilizado em paralelo, o sistema de pontuação descrito nas novas recomendações do ACMG (Riggs *et al.*, 2020), uma “calculadora de classificação de CNV” (disponível em: <http://cnvcalc.clinicalgenome.org/cnvcalc/>). Conforme a figura 15, segue o sistema métrico de classificação.



**Figura 15** – Métrica de classificação de variantes de número de cópias (CNVs) segundo o *guideline* de classificação preconizadas pelo ACMG (Riggs *et al.*, 2020).

Adicionalmente, para auxiliar na análise das CNVs obtidas por meio do *software* BlueFuse<sup>TM</sup> Multi v4.4 (BlueGnome®), foram utilizados bancos de dados como Frankilin, Varsome e X-CNV para auxílio da classificação e obtenção de informações sobre a região genômica.



# Resultados

---

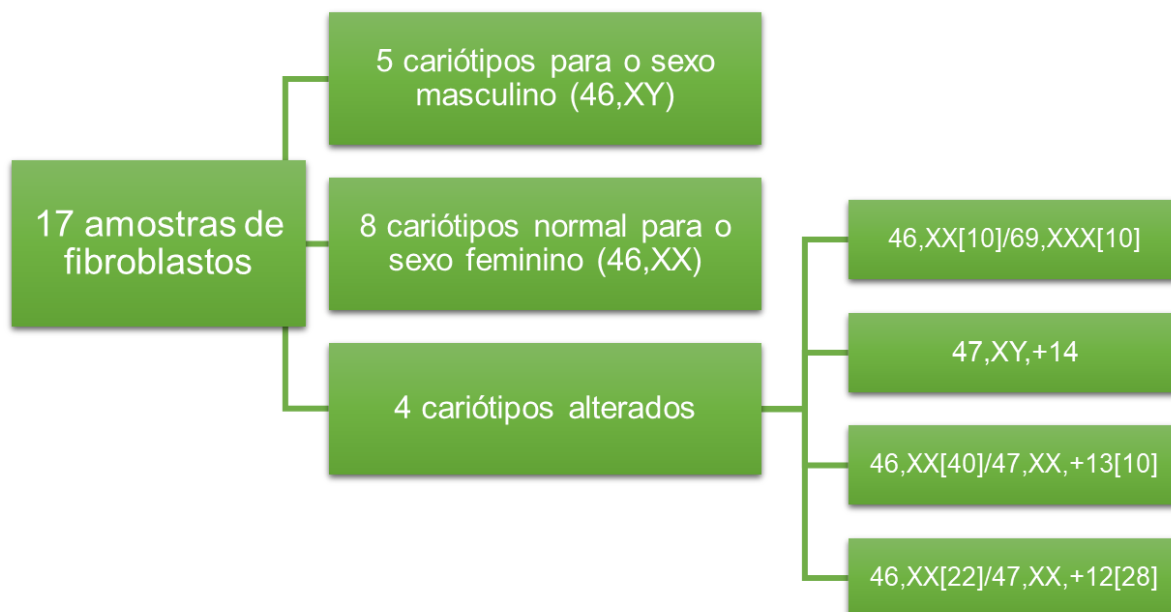
#### 4. RESULTADOS

Neste estudo foram estudados 21 conjuntos de amostras, referentes a 21 pacientes (14 do sexo feminino e sete do sexo masculino) com ADG e/ou DI associado ao mosaicism pigmentar, pelas técnicas de cariotipagem clássica por bandamento G e *array* genômico, totalizando 84 amostras.

Para as amostras coletadas que foram submetidas ao estudo citogenético conseguimos obter um crescimento celular adequado em 21/21 amostras de sangue periférico e, em 17/21 amostras de fibroblastos. A seguir podemos visualizar os resultados de cariotipagem por bandamento G em sangue periférico (Figura 16) e em fibroblastos (Figura 17).



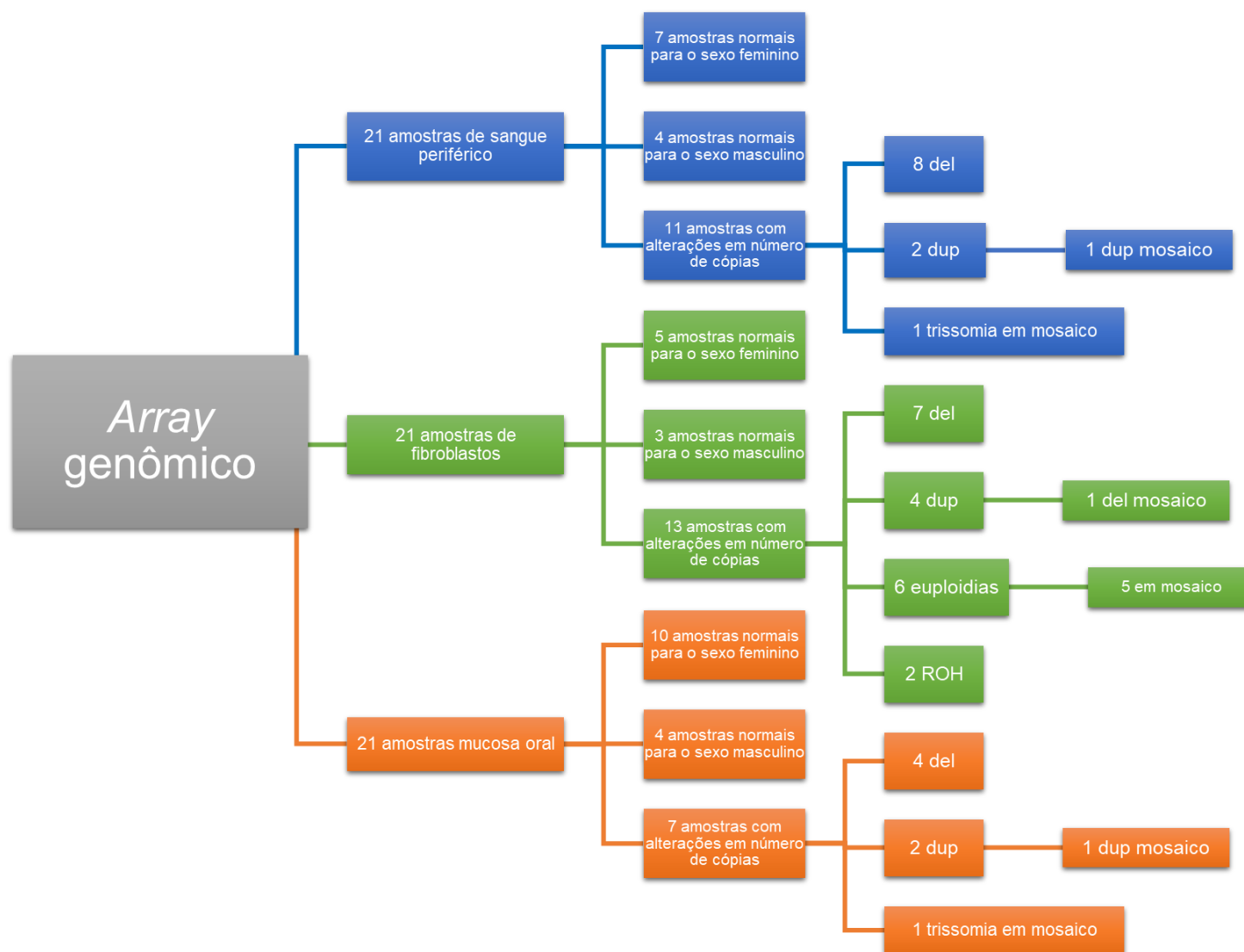
**Figura 16** – Fluxograma contendo os resultados simplificados das amostras submetidas a cariotipagem por bandamento G.



**Figura 17** – Fluxograma contendo os resultados simplificados das amostras submetidas a cariotipagem por bandamento G.

As amostras coletadas para a técnica de *array* genômico, sendo 21 amostras de sangue periférico, 21 amostras de fibroblastos e 21 amostras de mucosa oral, foram submetidas a verificação quanto à integridade e concentração do material e, por fim, consideradas adequadas para a realização da técnica. Na figura 18 podemos ter uma melhor visualização dos resultados simplificados detectados nessas amostras submetidas ao *array*.

A Tabela 1 mostra em detalhes os resultados obtidos neste estudo, evidenciando o sexo, amostra coletada e os resultados obtidos em cada técnica.



**Figura 18** – Fluxograma contendo os resultados simplificados das amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral submetidas ao *array* genômico.

Tabela 1 – Resultados obtidos pelas técnicas de cariotipagem por bandamento G e *array* genômico (continuação)

Paciente	Sexo	Amostra	Cariótipo	Array	Tamanho CNV	Classificação CNV	% mos	Tp mos	Mecanismo
PY01	M	SG	46,XY	arr[GRCh37] 17q21.31(44164956_44350090)x3 mos	185,1 kb	PP	60%		
		FB	46,XY	arr[GRCh37] 17q21.31(44164956_44292319)x3 mos	127 kb	PP	60%	Intra	NAHR
		MO	-	arr[GRCh37] 17q21.31(44164956_44350090)x3 mos	185,1 kb	PP	60%		
PY02	F	SG	46,XX	arr[GRCh37] 16p13.3(3,841,602_3,856,193)x1	14,5 kb	PP			NHEJ
		FB	46,XX	arr[GRCh37] 3p25.2(12660099_12709167)x1 arr[GRCh37] 12q13.3(56625045_56844290)x1	49 kb 219,2 kb	PP VUS	-	Inter	NHEJ
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY03	F	SG	46,XX	arr[GRCh37] 15q24.1(67,394,921_67,407,997)x1		PP			NHEJ
		FB	46,XX	arr[GRCh37] 6q23.3-q25.1(136,213,579_149,517,720)x2 hmz arr[GRCh37] Xq11.1-q13.1 (62,661,777_67,836,951)x2 hmz	13 Mb 5 Mb	VUS	-	Inter	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY04	F	SG	46,XX						
		FB	-	arr[GRCh37] 20q13.12-q13.33(44099337_62,948,788)x3 arr[GRCh37] Xq25-q28(124213093_155236712)x1	19 Mb 31 Mb	P	-	-	NAHR
		MO	-						
PY05	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY06	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-		
		FB	46,XX[10]/69,XXX[10]	arr(X,1-22)x3 mos	-	P	50%	Intra e Inter	MI
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY07	M	SG	46,XY,9ph+	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-		
		FB	47,XY,+14	arr[GRCh37] 14q11.2-q32.33(19255726_107287663)x3	88 Mb	P	100%	Inter	MIT
		MO	-	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-

Tabela 1 – Resultados obtidos pelas técnicas de cariotipagem por bandamento G e *array* genômico (continuação)

Paciente	Sexo	Amostra	Cariótipo	Array	Tamanho CNV	Classificação CNV	% mos	Tp mos	Mecanismo
PY08	F	SG	46,XX	arr[GRCh37] 17q21.31(43980384_44109188)x1	128,8 kb	P			
		FB	46,XX	arr[GRCh37] 17p13.3(2,510,312_2,558,509)x1	48,2 kb	VUS	-	-	NAHR
		MO	-	arr[GRCh37] 17q21.31(43986396_441975020)x1	211 kb	P			
		MO	-	arr[GRCh37] 17q21.31(43986396_441975020)x1	211 kb	P			
PY09	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	-	arr[GRCh37] 12p13.33-p11.1(191,619_34,853,011)x4	34 Mb	P	40%	Inter e Intra	MI
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY10	F	SG	46,XX	arr[GRCh37] 16p13.3(3,901,709_3,912,618)x1	10 kb	VUS			
		FB	46,XX[22]/47,XX,+12[28]	arr(12)x3 mos	-	P	45%	Inter e Intra	MI
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY11	M	SG	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
PY12	M	SG	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
PY13	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY14	F	SG	45,XX,der(17;22)t(17;22),-22	arr[GRCh37]17p13.3(8,547_1,732,977)x1	1,7 Mb	P	-	-	
		FB	-	arr[GRCh37]17p13.3(8,547_1,246,555)x1	1,2 Mb	P	-	-	NAHR
		MO	-	arr[GRCh37]17p13.3-p13.1(1,268,569_8,741,377)x3	7,5 Mb	P	-	-	
		MO	-	arr[GRCh37]17p13.3(8,547_1,732,977)x1	1,7 Mb	P	-	-	

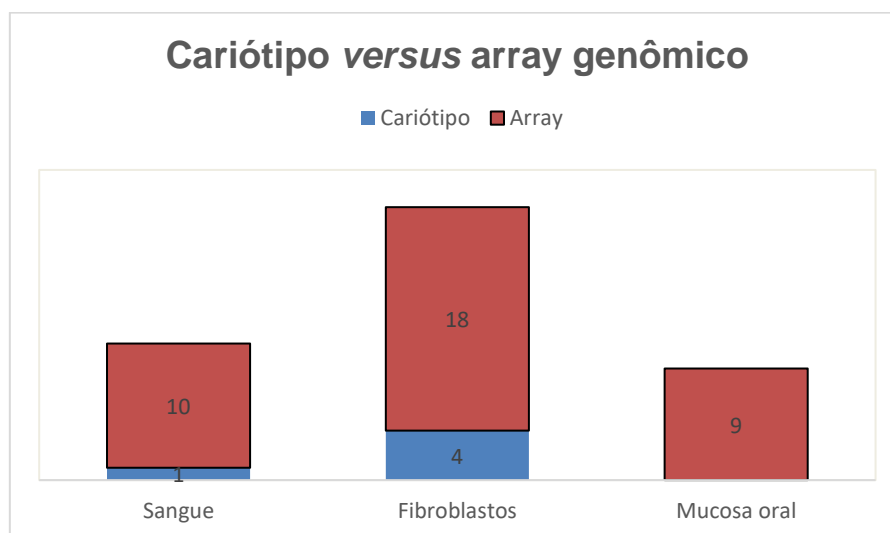
**Tabela 1** – Resultados obtidos pelas técnicas de cariotipagem por bandamento G e *array* genômico (conclusão)

Paciente	Sexo	Amostra	Cariótipo	Array	Tamanho CNV	Classificação CNV	% mos	Tp mos	Mecanismo
PY15	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY16	F	SG	46,XX	arr(13)x3 mos	-	-	-	-	-
		FB	46,XX[40]/47,XX,+13[10]	arr(13)x3 mos	-	P	15-20%	Inter e Intra	MIT
		MO	-	arr(13)x3 mos	-	-	-	-	-
PY17	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
PY18	M	SG	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	-	arr(15)x3 mos	-	P	40%	Inter e Intra	M1
		MO	-	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
PY19	M	SG	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XY	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,Y)x1,(1-22)x2	-	-	-	-	-
PY20	M	SG	46,XY	arr[GRCh37] 11q25(131600723_134934063)x1	3,3 Mb	P	-	-	-
		FB	46,XY	arr[GRCh37] 11q25(131600723_134934063)x1	3,3 Mb	P	-	-	NHEJ
		MO	-	arr[GRCh37] 11q25(131600723_134934063)x1	3,3 Mb	P	-	-	-
PY21	F	SG	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		FB	46,XX	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-
		MO	-	arr(X,1-22)x2	-	-	-	-	-

**LEGENDA:** M – Masculino; F – Feminino; S – Sangue periférico; FB – Fibroblastos; MO – Mucosa oral; P – Patogênica; PP – Provavelmente patogênica; VUS – Variante de significado clínico incerto; Mos – Mosaicismo; Tp – Tipo; % - Porcentagem; Intra – mosaicismo intratecidual; Inter – mosaicismo intertecidual; MIT – não disjunção mitótica ; MI – não disjunção na meiose I.

#### 4.1 Integração de dados e detecção de mosaicismo

Ao integrarmos os resultados de cariótipo e de *array* entre os tecidos avaliados por ambas as técnicas, pudemos observar que houve uma grande diferença na detecção de alterações genômicas. Enquanto o cariótipo detectou uma alteração em sangue periférico, o *array* conseguiu detectar dez alterações clinicamente relevantes. Já em fibroblastos, o cariótipo detectou apenas quatro alterações e o *array* detectou 18 alterações relevantes. E apesar de não ter sido aplicado a cariotipagem na mucosa oral devido às limitações técnicas, o *array* possibilitou a identificação de nove variantes neste tecido. Podemos observar estes dados no gráfico 1.



**Gráfico 1** – Comparação de detecção de alterações genômicas entre as técnicas de cariotipagem clássica e de *array* utilizando amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral.

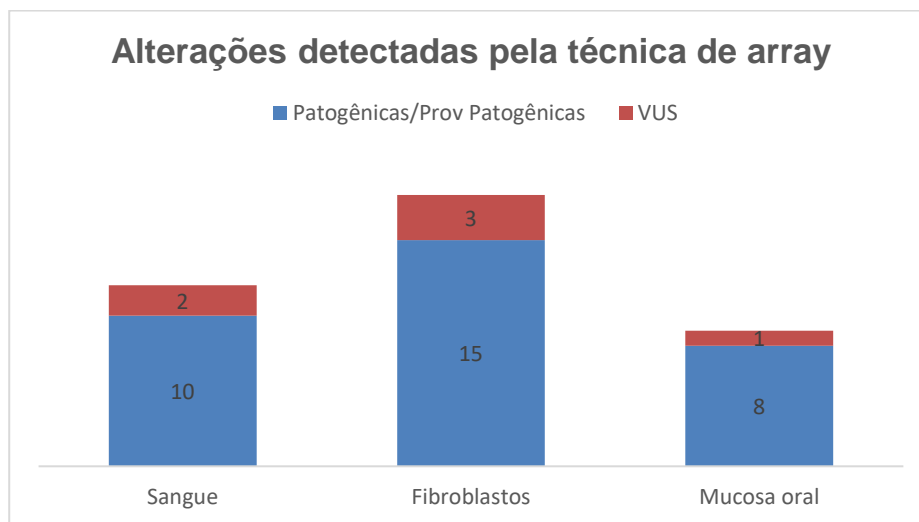
A cariotipagem clássica nos permitiu a identificação de mosaicismo intratecidual em duas amostras de fibroblastos e em nenhuma de sangue periférico. Já o *array* identificou alterações em mosaico nos tecidos avaliados, sendo duas em sangue periférico, cinco alterações em fibroblastos e duas alterações na mucosa oral.

Com a técnica de *array* genômico aplicada aos três tecidos aqui estudados pudemos detectar um total de 39 variações em número de cópias, dentre elas deleções, duplicações e ROH. Destas, segundo as evidências, 33 foram



classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas e seis delas foram classificadas como VUS. No gráfico 2 conseguimos visualizar estas alterações e em quais dos tecidos foram identificadas.

Destas alterações identificadas, 5/21 estão presentes concomitantemente nos três tecidos estudados, 1/21 foi identificada apenas em fibroblastos e mucosa oral e nenhuma apenas em sangue periférico e mucosa oral.



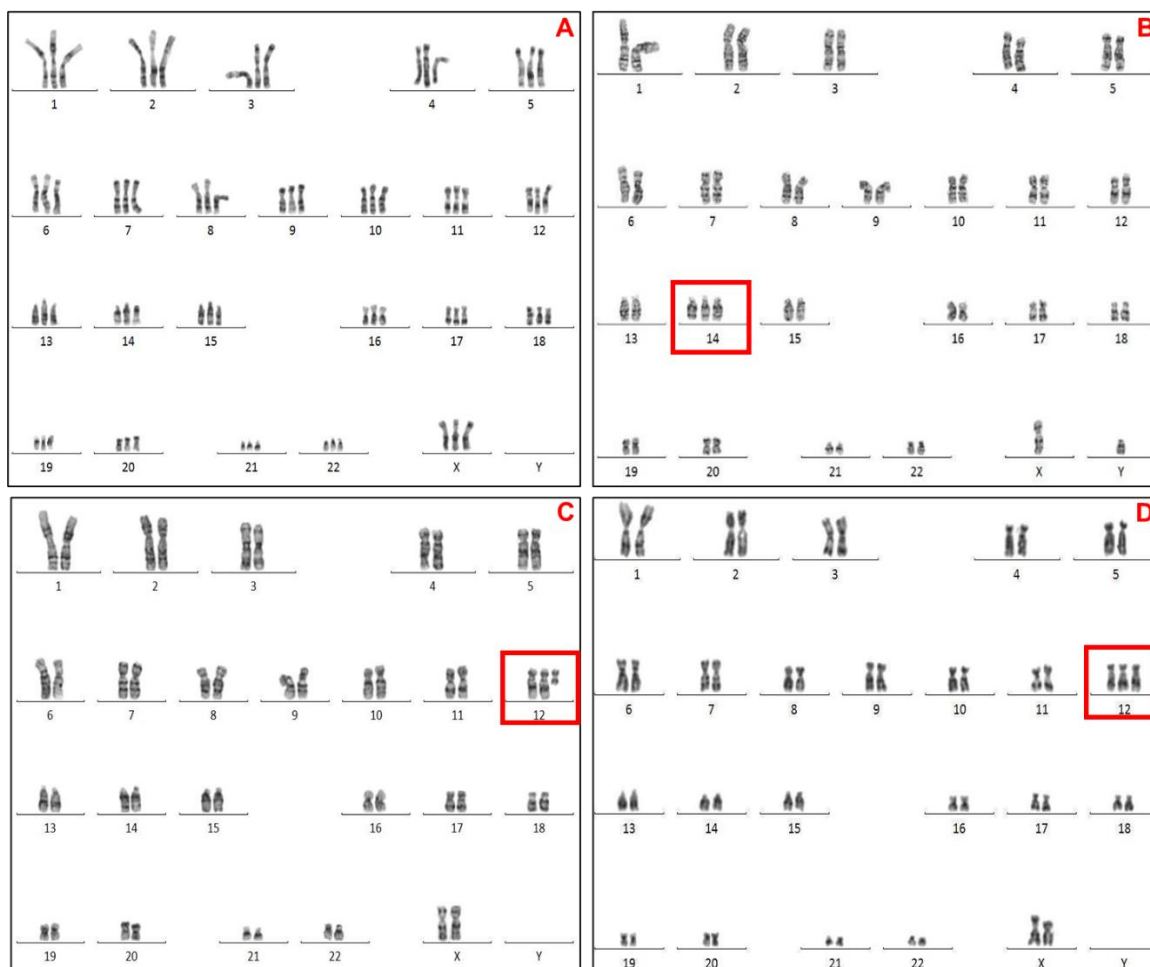
**Gráfico 2** – Elucidação das alterações genômicas detectadas neste estudo pela técnica de *array* utilizando amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral, que fazem relação com os fenótipos clínicos apresentado pelos pacientes.

## 4.2 Correlação genótipo-fenótipo

Para uma melhor integração dos dados e correlação genótipo-fenótipo, separamos os pacientes em grandes grupos, de acordo com as alterações encontradas em suas amostras:

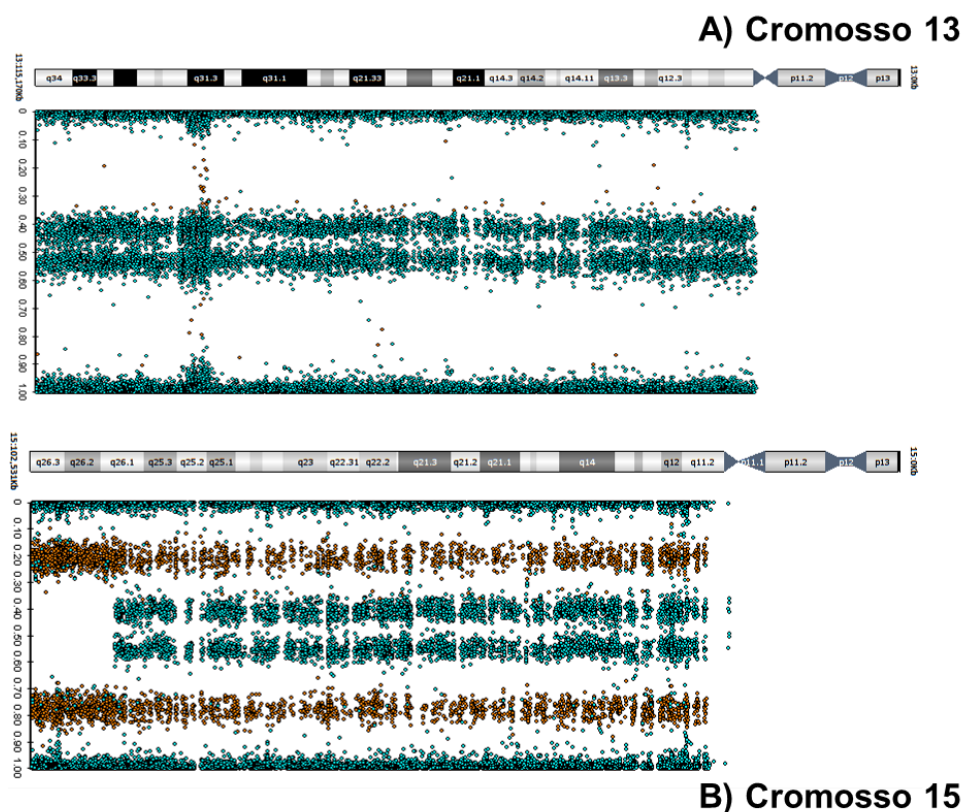
- **Alterações cromossômicas numéricas:** Seis pacientes avaliados neste estudo apresentaram resultados compatíveis com alterações cromossômicas numéricas em mosaico inter e intratecidual, sendo um caso com triploidia (paciente Y06), um caso com trissomia do 14 (paciente PY07), um caso de trissomia do 12 (paciente Y10), um caso com trissomia do 13 (paciente Y16), um caso com trissomia do 15 (paciente Y18) e um caso de tetrassomia de 12p (paciente Y09).

Na figura 19 podemos visualizar um compilado dos resultados de cariótipo de fibroblastos destes pacientes.



**Figura 19** – Cariogramas de fibroblastos dos pacientes A) Y06, B) Y07, C) Y09 e D) Y10 evidenciando a alterações encontradas. Para as pacientes Y06, Y09 e Y10, as alterações foram visualizadas sob a forma de mosaico dentro do tecido de pele (fibroblastos), ou seja, mosaicismo intratecidual. Já para o paciente Y07 a trissomia foi visualizada em todas as células de fibroblastos analisadas, no entanto, não foi visualizada em sangue periférico e mucosa oral.

Já na figura 20, podemos visualizar os resultados obtidos pela técnica de *array* realizada nas amostras de fibroblastos, sangue periférico e mucosa oral.



**Figura 20** – Imagem demonstrativa obtida do *software* de análise *Bluefuse Multi*, evidenciando (A) uma trissomia do 13 em mosaico, nas amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral, da paciente Y16. Esta trissomia está em um mosaico de 15-20% dentro dos tecidos (intratecidual). (B) Trissomia do 15 em mosaico de 40% em fibroblastos. Devido ao padrão de distribuição de sondas, há um indicativo de que há presença de alelos da linha euploide e trissômica sejam distintos, podendo indicar uma dissomia uniparental.

- **Deleções, duplicações e ROH:** Cinco pacientes avaliados neste estudo apresentaram resultados compatíveis com microdeleções e/ou microduplicações em regiões distintas do genoma, detectadas pelo *array*. Já duas pacientes apresentaram grandes deleções e duplicações concomitantes.

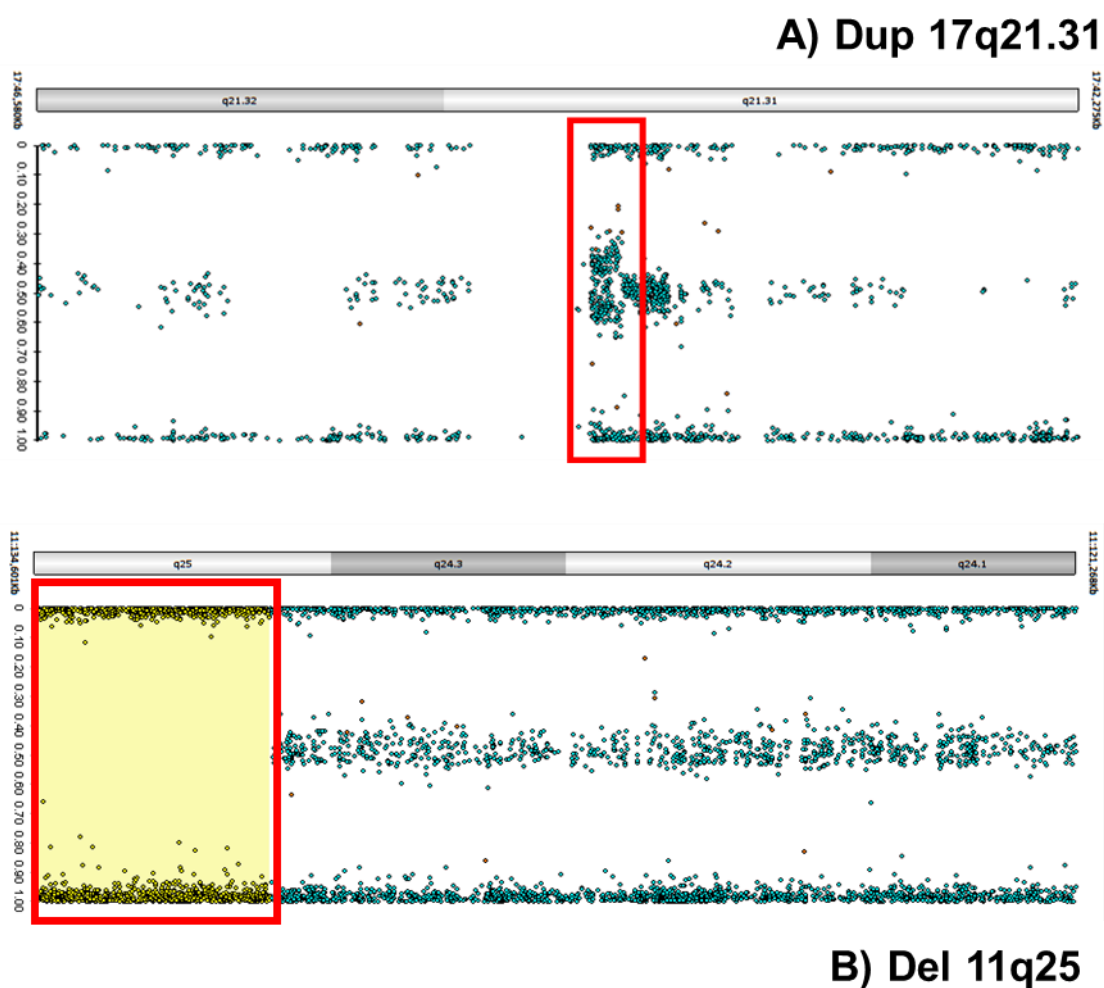
O PY01 apresentou uma microduplicação em 17q21.31 em mosaico, presente nos três tecidos estudados, em uma proporção de 60% das células, significando que há um mosaicismo constitucional nos tecidos estudados. Já a PY08 apresentou uma deleção na mesma região (17q21.31) presente em todos os tecidos estudados.

A PY02 apresentou uma microdeleção em 16p13.3 em sangue periférico; e em fibroblastos e mucosa oral: uma microdeleção em 3p25.2 e em 12q13.3, observando-se assim um mosaicismo intertecidual.

A PY03 apresentou uma microdeleção em 15q24.1 em sangue periférico, observando-se assim um mosaïcismo confinado ao tecido. Adicionalmente para esta paciente foi visualizado duas ROH, uma na região 6q23.3-q25 e outra em Xq11.1-q13.1.

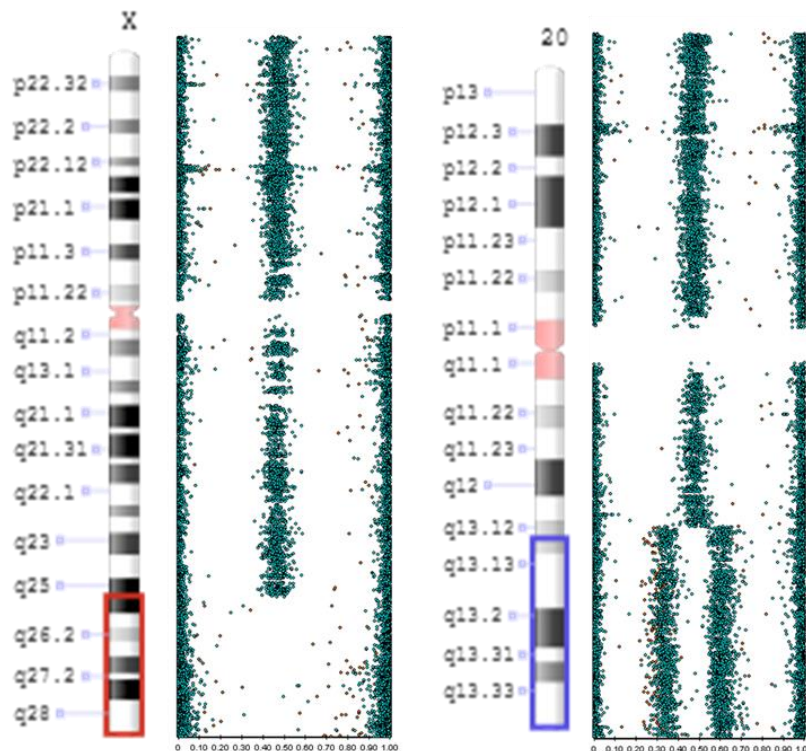
O PY20 apresentou uma deleção em 11q25 em todos os tecidos estudados.

A seguir, na figura 21, temos exemplos de alguns resultados obtidos pelo *array* genômico.



**Figura 21** – Imagem demonstrativa obtida do *software* de análise *Bluefuse Multi*, evidenciando (A) uma duplicação em 17q21.31 em mosaico, nas amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral, do paciente Y01. (B) Deleção em 11q25 presente nas amostras de sangue periférico, fibroblastos e mucosa oral do paciente Y20. O *highlight* em vermelho evidencia o local exato das alterações.

Duas pacientes deste estudo apresentaram grandes CNVs concomitantes. A PY04 evidenciou concomitantemente uma duplicação em 20q13.12q13.33 e uma deleção em Xq25q28 (Figura 22), nos três tecidos estudados.

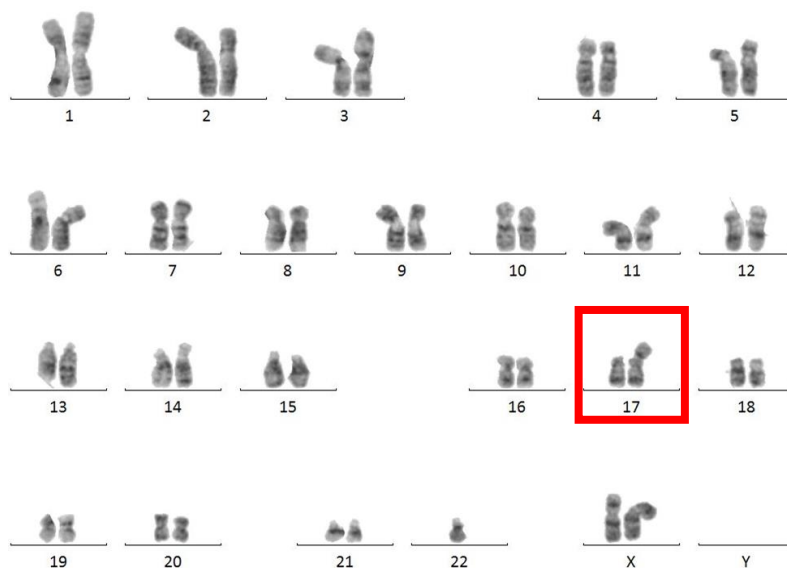


**Figura 22** – Imagem demonstrativa obtida do *software* de análise *Bluefuse Multi*, evidenciando uma deleção em Xq25-q28 (evidenciada em vermelho) e uma duplicação em região 20q13.12-q13.33 (evidenciada em azul), nos três tecidos estudados.

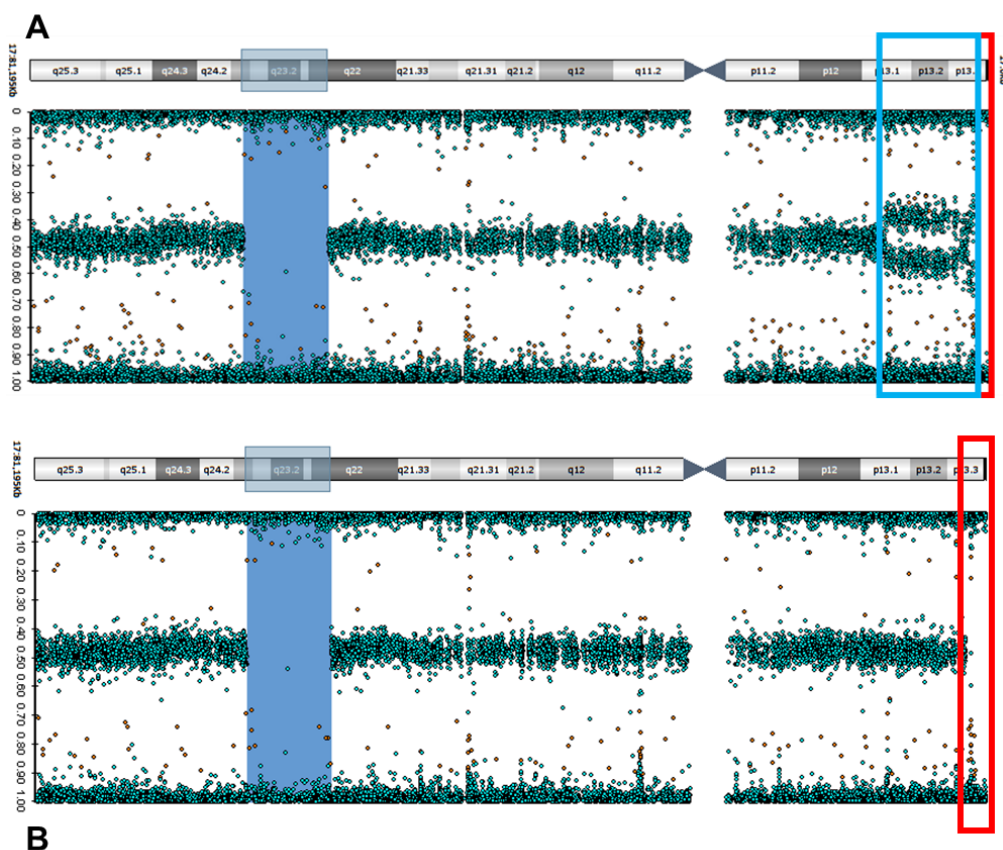
A PY14 evidenciou um rearranjo cromossômico no cariótipo de sangue periférico (45,XX,der(17;22)t(17;22),-22) (Figura 23). Pelo array genômico conseguimos obter o seguinte resultado:

- **Fibroblastos:** uma deleção em 17p13.3 seguida de uma duplicação (17p13.3-p13.1) (Figura 24).

- **Sangue periférico e mucosa oral:** uma deleção em 17p13.3 (Figura 22).



**Figura 23** - Cariograma de linfócitos obtido a partir de sangue periférico da paciente Y14, evidenciando uma cromossomo derivado.



**Figura 24** – Imagem demonstrativa obtida do *software* de análise *Bluefuse Multi*, evidenciando A) uma deleção em 17p13.3 (evidenciada em vermelho) seguida de uma duplicação em 17p13.3-p13.1 (evidenciada em azul), em fibroblastos. B) uma deleção em 17p13.3 (evidenciada em vermelho).



- **Sem alterações:** Oito pacientes avaliados neste estudo não apresentaram nenhuma alteração em número de cópias relevantes para o fenótipo clínico.

#### 4.2.1 Fenótipo Clínico

Por meio da anamnese clínica realizada em colaboração com os médicos residentes da Unidade de Genética do ICr, obtivemos as informações fenotípicas dos pacientes deste estudo. Compilamos todos os fenótipos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Compilação dos fenótipos clínicos dos pacientes deste estudo.

Fenótipos	Pacientes	Fenótipos	Pacientes
ADG	21/21	Orelhas displásicas	3/21
DI (leve a grave)	21/21	Perda auditiva	3/21
Manchas pigmentares	21/21	Palato alto	7/21
RCIU	2/21	Fenda labial	1/21
Oligodrâmnio	1/21	Fenda palatina	2/21
Assimetria facial	4/21	Cupid's bowl	2/21
Assimetria de membros	5/21	Filtro naso labial curto	1/21
Hemi-hipertrofia	2/21	Filtro naso labial longo	1/21
Baixa estatura	6/21	Alterações dentárias	6/21
Convulsões	5/21	Escoliose	7/21
Microcefalia	5/21	Hérnia inguinal	1/21
Macrocefalia	3/21	Hérnia umbilical	3/21
Alopécia	4/21	Clinodactilia	7/21
Face alongada	4/21	Aracnodactilia	1/21
Pescoço curto	2/21	Alterações esqueléticas	2/21
Hipotonia	4/21	Alterações cardíacas	10/21
Hipertelorismo ocular	6/21	Alterações renais	2/21
Estrabismo convergente/divergente	5/21	Alterações genitais	4/21
Miopia	2/21	Infecções recorrentes	2/21
Retrognatía	1/21	Hipertricose	1/21
Anquiloglossia	1/21	Hálux valgo	1/21

Como podemos observar na tabela 2, todos os pacientes apresentam ADG e/ou DI associados às manchas pigmentares em linhas de Blaschko, que foi o critério de inclusão para este estudo. No entanto observando os outros fenótipos apresentados pelos pacientes, as mais comuns entre eles foram as alterações cardíacas (10/21), escoliose (7/21), clinodactilia (7/21), palato alto (7/21), baixa estatura (6/21) e hipertelorismo ocular (6/21). Houve também outros fenótipos observados compartilhados entre os pacientes, e aqueles que foram exclusivos em apenas um paciente.

A seguir temos uma imagem abrangendo todos os pacientes estudados (Figura 25).



**Figura 25** – Compilação fotográfica de todos os pacientes com ADG e/ou DI associado ao mosaicism pigmentar, incluídos neste estudo. A sequência das imagens segue a mesma ordem dos pacientes descritos na Tabela 1. Não está contido nesta figura apenas a paciente PY13 pois esta não havia autorização dos pais ou responsáveis para a utilização de fotos.



# Discussão

---

## 5. DISCUSSÃO

Comparando os resultados obtidos por ambas as técnicas utilizadas neste estudo (cariotipagem clássica e *array* genômico), observamos que houve uma disparidade para a identificação de alterações cromossômicas e/ou genômicas que explicassem o quadro fenotípico dos pacientes, sendo a pele (fibroblastos) o tecido com um maior número de alterações patogênicas, fato este, relacionado com o mosaicismos pigmentar.

Dentre essas amostras coletadas e avaliadas neste estudo, o *array* nos permitiu identificar alterações genômicas presente no genoma dos pacientes selecionados, totalizando 39 alterações em número de cópias classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, que explicassem o fenótipo clínico dos pacientes. Dessa forma, foi possível obter ter um diagnóstico clínico para 13 dos 21 pacientes estudados.

Temos o conhecimento de que a cariotipagem clássica permite identificar apenas alterações de a partir de 5Mb, já a técnica de *array* genômico revela alterações de no mínimo 18 kb (segundo informações do fabricante). Como visualizado no caso Y10, detectamos uma deleção de 10kb envolvendo um gene importante, o *CREBBP*, que sabidamente é haploinsuficiente e pode estar modulando o fenótipo desta paciente (Stevens, 1993-2022).

Sendo assim, constatamos que apenas o cariótipo não foi o suficiente para identificar as alterações patogênicas causadoras dos fenótipos clínicos relatados pelos pacientes deste estudo, que foram visualizadas pelo *array*, e possibilitou a elucidação clínica dos casos coletados.

Outro ponto importante a ser considerado foi que, para as amostras de fibroblastos onde não foi possível obter um crescimento celular adequado para o estudo citogenético, conseguimos obter um DNA com quantidade e qualidade ideais para a técnica de *array*. Reforçando assim a ideia de que a extração de DNA deste tipo celular garante que as alterações estruturais e numéricas não sejam artefatos de cultura celular (*in vitro*), plausíveis de ocorrerem nesta por conta da duplicação celular que ocorre no momento da replicação.

Ainda, podemos citar o fato de que estudos de linfócitos e fibroblastos não cultivados refletem o mais próximo do real referente ao nível de mosaicismos presente no tecido estudado, pois as técnicas de cultura celular podem levar a

uma seleção tendenciosa de uma subpopulação de células consideradas normais.

O *array* genômico possibilitou a identificação de mosaicismo nos tecidos avaliados, se mostrando eficiente para a detecção e para inferir os níveis de mosaicismo naquele tecido, onde o menor nível aqui identificado foi de 15% de mosaicismo dentro de um mesmo tecido.

Com o avanço das técnicas moleculares, as alterações genômicas restritas a tecidos podem ser estudadas de uma forma cada vez mais detalhada. Um estudo realizado por Golabi e colaboradores (2010), utilizando técnicas citogenômicas, evidência a importância da investigação em diferentes tecidos, uma vez que, somente a análise em sangue periférico levaria a uma investigação etiológica inequívoca.

Ademais, a interpretação dos resultados exigiu tempo e aprendizagem, pois vários fatores (qualidade do DNA e a presença de alterações em mosaico em diferentes graus) poderiam interferir nas alterações informadas pelo *software*, uma vez que a análise de mosaicismo pela técnica de *array* não é usualmente realizada e ainda é pouco conhecida. Dentro de uma análise de 21 pacientes identificamos 13 pacientes com alterações genômicas em mosaico e nos outros oito pacientes não identificamos alterações pelas técnicas aqui utilizadas. Embasado na casuística deste estudo, há uma probabilidade de 61,9% dos pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do ICr-HCFMUSP apresentarem alterações genômicas em mosaico.

### **5.1 Alterações cromossômicas numéricas**

Cromossomos extras ou ausentes são as anormalidades genéticas mais comuns em embriões humanos e são a principal causa de abortos espontâneos. Pelo menos 10% dos conceptos aneuplóides ou triploides abortam espontaneamente, 0,6% são natimortos e 0,0002% nascidos vivos (Zaragoza *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2018).

Em nossa casuística identificamos cinco pacientes com aneuploidias de distintos cromossomos e uma paciente com um conjunto cromossômico triploide. Um ponto importante é que todas estas alterações numéricas encontradas foram visualizadas sob a forma de mosaico, seja intra ou intertecidual. Isto explica o

fato de uma maior sobrevida e de um fenótipo minimizado nestes pacientes, quando comparados com pacientes com aneuploidias ou triploidia em todas as suas células constitucionais, sem o mosaicismo presente (Zaragoza *et al.*, 2000; Posey *et al.*, 2016; Carson *et al.*, 2018; Ariad *et al.*, 2021).

A importância de se distinguir o mecanismo de origem das aneuploidias e/ou triploidia é valiosa para o entendimento do genoma humano, visto que mais de 10% dos abortos são decorrentes de alterações numérica de cromossomos humanos. Esses diferentes mecanismos refletem um efeito direto no feto que está em desenvolvimento (Carson *et al.*, 2018; Ariad *et al.*, 2021). Quando a não-disjunção ocorre na meiose, é provável que haja uma constituição aneuplóide ou triploide nos primeiros estágios do desenvolvimento e que se propaga para todas as células do zigoto. Já para casos de uma não-disjunção na mitose pós-zigótica, a aneuploidia ou triploidia surge em estágios mais adiante no desenvolvimento, afetando apenas um conjunto de tecidos do zigoto (Zaragoza *et al.*, 2000; Posey *et al.*, 2016; Carson *et al.*, 2018; Ariad *et al.*, 2021).

De acordo com os gráficos *BAF* obtidos do *software* de análise *array*, pudemos inferir os possíveis mecanismos que levaram as alterações aqui visualizadas (Conlin *et al.*, 2010). No caso do PY18 que apresentou a trissomia do 15 em mosaico, podemos inferir que o padrão visualizado no *array* seja consistente com uma não-disjunção na meiose I seguida por um resgate trissômico que levou a uma UPD. O padrão de “deleção” perto da região telomérica do braço q é sugestivo de uma isodissomia para esta região (Figura 23). Já no caso dos PY14 e PY07, a trissomia do 13 e 14, respectivamente, podemos inferir que tenha decorrido de uma não-disjunção mitótica. E nos casos PY06, PY09 e PY10, inferimos que as alterações tenham decorrido de uma não-disjunção meiótica (Conlin *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos, como nos nossos aqui relatados, a análise de amostra de sangue periférico não é o suficiente para detectar uma linhagem celular alterada, sendo necessário expandir a análise genômica para amostras de fibroblastos, ou de outros tecidos disponíveis.

O fenótipo clínico distinto apresentado por estes pacientes pode sobrepor o aspecto clínico de algumas síndromes, devido a isto o estudo deve ser realizado em mais de um tecido, utilizando também técnicas moleculares como o *array*, para a confirmação desta síndrome ou de alterações que expliquem o

fenótipo (Ariad *et al.*, 2021). Ainda, a variabilidade fenotípica vista em nossos pacientes está relacionada com a presença de linhagens celulares normais concomitantes com linhagens celulares alteradas, em diferentes tecidos.

## 5.2 Deleções, Duplicações e ROH

A estabilidade genômica é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento normal do organismo. No entanto, devido a algumas características estruturais da dupla fita de DNA, algumas regiões apresentam uma maior suscetibilidade a rearranjos, levando assim a uma instabilidade genômica (Cook e Scherer, 2008; Chen *et al.*, 2010; Alkan, Coe e Eichler, 2011).

Sabe-se que mais de 12% do genoma de qualquer indivíduo pode apresentar alterações em números de cópias, ou seja, indivíduos normais e saudáveis também podem ser portadores de CNVs, porém, estas não levam a um fenótipo clínico (Cook e Scherer, 2008; Chen *et al.*, 2010).

No entanto, as CNVs também são responsáveis pela grande variedade de manifestações clínicas em diversos quadros malformativos, podendo afetar a função dos genes envolvidos devido a uma interrupção gênica da região codificadora e/ou reguladora, por efeito de posição, dosagem gênica ou fusões gênicas (Cook e Scherer, 2008; Chen *et al.*, 2010). As CNVs podem alterar os níveis de expressão gênica, e quando envolvem genes sensíveis a dosagem conseqüentemente levam a fenótipos clínicos distintos. Como observado neste estudo, detectamos cinco pacientes portadores de deleções e duplicações, com tamanhos distintos entre 10 kb a 3 Mb. Também identificamos deleções e duplicações concomitantes em duas pacientes, sugestivo de um evento de translocação herdado de um dos genitores.

Para os pacientes Y01 e Y08, que apresentaram CNVs em 17q21.31, dada as LCRs presentes nas proximidades desta região cromossômica, é possível inferirmos que o mecanismo gerador desta alteração foi o NAHR. Já para os pacientes PY02, PY03 e PY20, devido à ausência de elementos repetitivos nas regiões do ponto de quebra, descartamos a possibilidade de um mecanismo recorrente, como NAHR, inferindo assim o NHEJ como mecanismo gerador destas CNVs.

Adicionalmente, como visualizamos neste estudo, a PY03 foi a única neste estudo que apresentou grandes ROH. ROH é um trecho genômico sem heterozigosidade no estado diploide, e muitas das vezes estão relacionadas com consanguinidade parental, o que não foi relatado no histórico familiar da presente paciente. No entanto, as ROH são de extrema importância para o desenvolvimento fenotípico das doenças recessivas.

A seguir, descrevemos com mais detalhes, alguns dos pacientes aqui estudados.

### **- Paciente Y01 e Y08**

Ambos apresentaram uma CNV na região de 17q21.31, no entanto o PY01 apresentou uma duplicação em mosaico intratecidual e a PY08 apresentou uma deleção da região, presente em todos os tecidos.

Esta região está associada a *Koolen-De-Vries Syndrome* (KdVS) (#610443) e *17q21.31 Duplication Syndrome* (#613533). Na literatura, é relatado que ambas as síndromes apresentam uma ampla gama fenotípica, sendo o atraso psicomotor e deficiência intelectual as mais relatadas. No entanto, já foram observados também anormalidades renais, como visto em ambos os pacientes (Kitsiou-Tzeli *et al.*, 2011; Natacci *et al.*, 2016).

O cromossomo 17 é o segundo segmento genômico que contém o maior conteúdo gênico, abrigando diversos genes sensíveis a dosagem (ou seja, haploinsuficientes), como o *PMP22*, *PAFHA1B1*, *RAI1*, *NF1* e *KANSL1*, que foram descritos sendo a causa de diversas síndromes genéticas (Boettger *et al.*, 2012). Acrescento ainda, que o cromossomo 17 possui 8,6% de LCRs ao longo do seu conteúdo. Essas, são sequências de DNA repetitivas, que variam entre 1-200 kb e compartilham uma homologia entre suas sequências em mais de 90%. Desempenham assim um papel fundamental nas recombinações meióticas que resultam em deleções, duplicações e inversões nas regiões genômicas por meio do mecanismo NAHR, mecanismos inferidos para ambos os casos aqui descritos (Stefansson *et al.*, 2005).

## - Paciente Y02

A presente paciente apresentou uma deleção em 3p25.1 de 49kb envolvendo o gene *RAF1*, que está associado na literatura com a Síndrome de Noonan 5 (OMIM #611553) e a Síndrome de Leopard (OMIM #611554), também conhecida como Noonan com múltiplos lentigos (Tartaglia, Gelb e Zenker, 2011; Carcavilla *et al.*, 2020).

Ambas as síndromes apresentam um fenótipo clínico heterogêneo de expressividade variável caracterizada por atraso de crescimento consequentemente levando a baixa estatura, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, fendas palpebrais inclinadas para baixo, cardiopatia congênita (principalmente estenose pulmonar), anormalidades torácicas, alterações dentárias, manchas cutâneas, miopia e perda audição também foram relatados (Tartaglia, Gelb e Zenker, 2011; Carcavilla *et al.*, 2020). Características essas que foram vistas em nossa paciente, no entanto, de uma forma mais branda.

Acrescentamos ainda, que a deleção em 12q13.3 de 219,2 kb, envolve o gene *SLC39A5*, que na literatura está relacionado com Miopia 24, autossômica dominante (OMIM #615946). Este é um gene que codifica uma proteína que pertence à família de transportadores de zinco. Curiosamente, o zinco é um fator essencial para o desenvolvimento dos olhos e a deficiência de zinco foi relatada em pacientes com alta miopia (Huibi *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2014).

Estudos recentes de GWAS evidenciaram distintos genes envolvidos na etiologia genética da miopia, sendo um deles o gene *SLC39A5*. Ainda, conseguiram evidenciar a expressão deste gene em todos os estágios de desenvolvimento embrionário de camundongos, sendo expresso principalmente na esclera e na retina. Foi visto também, que o zinco regula a via BMP/TGF- $\beta$ , e a desregulação desta via devido a uma variante no gene pode levar a erros de refração ocular e resultar em um fenótipo de miopia alta (Guo *et al.*, 2014). Todas as evidências apresentadas levam a confirmação da hipótese deste gene estar diretamente relacionado a alta miopia.

Apesar dos relatos da literatura terem sido baseados em estudos utilizando amostras de sangue periférico de indivíduos portadores de alta miopia, em nossa paciente encontramos esta alteração nas amostras de fibroblastos e mucosa oral, e não foi visualizada em sangue periférico. Nesse sentido, esta é uma

variante candidata para explicar o fenótipo de miopia grave relatado em nossa paciente.

Apesar de esta CNV estar se apresentando na forma de mosaico intertecidual, ou seja, presente em dois dos três tecidos estudados, sugerimos a hipótese de que, devido os fibroblastos e tecido ocular se tratar de tecidos com a mesma origem embrionária (origem ectodérmica), então esta variante pode estar presente também no tecido ocular, explicando assim o fenótipo agravado na paciente.

#### **- Paciente Y14:**

A presente paciente apresentou um cariótipo de sangue periférico alterado (45,XX,der(17;22)t(17;22,-22)) e CNVs na região de 17p13.3-p13.1 em fibroblastos, sangue periférico e mucosa oral.

Hipotetizamos que em fibroblastos também tenha a presença de um cromossomo derivado (17;22) também esteja ocorrendo em seus fibroblastos, e que durante as divisões celulares para diferenciação dos tecidos, houve uma falha de *crossing-over* mitótico levando a um despareamento que consequentemente gerou uma deleção seguida de uma duplicação. Estando presente apenas em fibroblastos, mas não visto em sangue periférico e mucosa oral.

Não foi visualizado nenhum ganho ou perda na região do cromossomo 22, no entanto é válido reforçar que a há limitação técnica, tanto do cariótipo que não detecta alterações menores do que 5 Mb, por isso não visualizamos a deleção em 17p13.3. Mas também há limitação do *array*, onde não há sondas na região do braço curto dos cromossomos acrocêntricos, não nos dando assim a informação se houve perda de material genômico no braço curto do cromossomo 22.

A deleção em 17p13.3, vista nos três tecidos estudados está relacionada na literatura com a Síndrome de Miller-Dieker (OMIM #247200). Esta é uma síndrome de deleção de genes contíguos, caracterizada por uma lissencefalia grave com dismorfismos faciais, DI, epilepsia e alterações neurológicas graves (Chen *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020).



Este fenótipo agravado se deve a haploinsuficiência do gene *PAFAH1B1*, importante para o desenvolvimento cerebral. Devido a sua função estar relacionada a sistema cerebral, o envolvimento deste gene em deleções é responsável pela forma mais grave de lissencefalia clássica. Fenótipo este não observado em nossa paciente, fato que pode ser explicado por que nenhuma das deleções em 17p13.3 vista nos três tecidos abrangem o gene *PAFAH1B1* (Chen *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2018). Ainda, é relatado na literatura que aproximadamente 80% dos casos de Miller-Dieker são *de novo*, mas pelo menos 20% dos casos relatados são de cromossomo derivado herdado de uma translocação equilibrada nos pais (Chen *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2018).

Já a duplicação em 17p13.3-p13.1, vista apenas em fibroblastos, tem aproximadamente 8Mb e esta região envolve 225 genes. Dentre esses, temos importantes genes como o *YWHAE* e *PAFAH1B1*. Estudos verificaram que a duplicação do gene *YWHAE* está relacionado com a manifestação de distintos dismorfismos faciais, enquanto a duplicação de *PAFAH1B1* que levam à sua superexpressão, foi associada a atraso de desenvolvimento moderado a grave e anormalidades cerebrais estruturais (Chen *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2018).

### 5.3 Pacientes sem alterações

Para os pacientes que não foram detectadas alterações genômicas relevantes clinicamente sugerimos a realização de um exame molecular mais detalhado, como um sequenciamento do genoma, exoma e verificação do status de metilação, para que possamos ter um diagnóstico preciso para a paciente. Portanto, mesmo que o resultado de cariótipo e do array tenham sido considerados normais, não destacamos a importância de outros estudos citogenômicos envolvendo múltiplos tecidos para elucidação do fenótipo clínico apresentado por estes pacientes (Conlin *et al.*, 2012; Vreeburg e van Steensel, 2012). Além do que, futuramente os dados genômicos obtidos destes pacientes serão reanalisados e revisitaremos os bancos de dados, para uma possível reclassificação dessas variantes genômicas.

# Considerações Finais

---

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível identificar 39 alterações genômicas em mosaico em 13/21 pacientes com ADG/MP. Observamos que a pele foi o tecido com um maior número de alterações patogênicas, fato este, relacionado com o mosaicismo pigmentar, e ressaltamos que o array genômico foi essencial para a caracterização molecular inequívoca de cada população celular dada a facilidade de obtenção de DNA de qualquer tipo de amostra.

O nosso estudo mostrou ainda que a associação genótipo-fenótipo, considerando diferentes tecidos, é imprescindível para a rotina diagnóstica para os pacientes ADG/MP. Bem como melhora o entendimento do papel da dosagem gênica, inter e intratecidual e sua relação com as manifestações clínicas.

# Conclusões

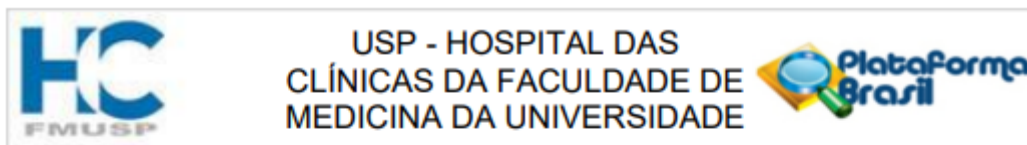
---

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível detectar a presença de alterações citogenômicas na condição de mosaico e avaliar sua influência sob o fenótipo clínico em pacientes com manchas cutâneas pigmentares e deficiência intelectual idiopática.
- ✓ Foi possível realizar o estudo citogenético por bandamento G em sangue periférico e fibroblastos.
- ✓ Foi possível realizar o teste de *array* em DNA extraído de células provenientes de mucosa oral.
- ✓ Foi possível determinar a influência exercida pelo mosaicismo sob o fenótipo clínico.
- ✓ Foi possível avaliar e correlacionar os possíveis mecanismos responsáveis pelas alterações observadas.
- ✓ Conseguimos estimar a frequência de mosaicismo para alterações citogenômicas entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do ICr-HCMFUSP.



## ANEXO A



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO CITOGENÔMICA EM PACIENTES COM ATRASO DE DESENVOLVIMENTO GLOBAL E MOSAICISMO PIGMENTAR

**Pesquisador:** Leslie Domenici Kulikowski

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 04329918.3.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.076.781

## Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, com finalidade de investigar a presença de alterações citogenômicas em diferentes tecidos, em pacientes com atraso de desenvolvimento global não explicado e mosaicismos pigmentar, com objetivo de auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento do mosaicismos intra e intercelular, além de melhorar a compreensão do efeito fenotípico. O projeto investigará as variantes com técnicas de cariotipagem clássica e array genômico. Serão estudados 20 pacientes com atraso de desenvolvimento global e manchas pigmentares em acompanhamento no Ambulatório de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HCFMUSP). Os participantes serão avaliados clinicamente e, após, serão coletadas amostras de três tecidos diferentes para cada paciente, sendo sangue periférico, pele e mucosa oral da seguinte maneira: 4 mL de sangue periférico em tubo contendo heparina sódica (tampa verde) para estudo citogenético e 4 mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA - tampa roxa) para extração de DNA e posteriormente estudo citogenômico pela técnica de SPN-array, um fragmento de 15 mm de pele da região que contém a mancha cutânea pigmentar para a extração de DNA e estudo citogenômico colhido por meio de punch e, raspado do epitélio bucal para obtenção de células do epitélio oral, sendo esta, destinada a extração de DNA e

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.076.781

posteriormente encaminhadas ao estudo citogenômico.

**Critério de Inclusão:**

Os critérios de inclusão deste projeto serão pacientes com manchas cutâneas pigmentares associadas ao atraso de desenvolvimento global.

**Critério de Exclusão:**

O critério de exclusão deste projeto serão pacientes que não possuem manchas cutâneas pigmentares associadas ao atraso de desenvolvimento global com cariótipo de sangue periférico normal ou conclusivo para o quadro clínico.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** O presente projeto pretende, a partir de uma análise clínica e citogenômica, auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento do mosaicismo intra e intertecidual, além de melhorar a compreensão do efeito fenotípico.

**Objetivo Secundário:** (1) Identificar alterações citogenômicas presentes em diferentes tecidos no mesmo paciente. (2) Correlacionar as alterações fenotípicas e o quadro clínico detalhado dos pacientes com as alterações citogenômicas identificadas.

(3) Inferir os mecanismos de origem dos mosaicismos identificados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco para os participantes é mínimo e inclui a coleta de sangue periférico e de amostra de pele. Também não há benefício para os participantes. Os benefícios deste projeto são a compreensão de mecanismos formadores de mosaicismo, bem como a correlação genótipo-fenótipo para um melhor aconselhamento genético. E, com os dados obtidos nesta pesquisa, poderemos compreender a influência exercida pelos diferentes graus de mosaicismo sob os fenótipos clínicos, fornecendo informações acerca da heterogeneidade fenotípica em nossa população.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo prospectivo, pouco invasivo, para melhorar o entendimento de doenças genéticas raras, e com risco mínimo para os participantes. Os métodos estão adequados ao objetivo e desenho do estudo. Os resultados poderão ser de muita utilidade para o esclarecimento da deficiência mental neste grupo de pacientes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores os seguintes documentos: folha de rosto, preenchida e assinada adequadamente; cadastro da pesquisa no CEP, adequado; TCLE adequado e bem claro;

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 3.076.781

cronograma adequado; anuência do Laboratório de Citogenética do HCFMUSP e da Chefia da Unidade de Genética do ICr HCFMUSP; Projeto completo.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Estudo prospectivo, pouco invasivo, para melhorar o entendimento de doenças genéticas raras, e com risco mínimo para os participantes. Os métodos estão adequados ao objetivo e desenho do estudo. Os resultados poderão ser de muita utilidade para o esclarecimento da deficiência mental neste grupo de pacientes. O projeto segue as normas brasileiras de ética em pesquisa e não há obstáculos para a sua aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1230183.pdf	10/12/2018 12:00:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_revisado_YancaGasparini.pdf	10/12/2018 03:01:19	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaanuenciaLIM.pdf	10/12/2018 02:43:30	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Outros	Cadastro_online_assinado_YancaGasparini_2018.pdf	10/12/2018 02:41:43	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Outros	ExequibilidadeYancaGasparini.pdf	10/12/2018 02:40:49	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Outros	CartaanuencialCr.pdf	10/12/2018 02:40:26	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_YancaGasparini.pdf	09/12/2018	Leslie Domenici	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.076.781

Folha de Rosto	Folhaderosto_YancaGasparini.pdf	00:22:42	Kulikowski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Yanca_Gasparini_Doc_2018.pdf	05/12/2018 15:25:12	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_YANCA.pdf	01/10/2018 21:20:11	Leslie Domenici Kulikowski	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 12 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar      **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585      **Fax:** (11)2661-7585      **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## ANEXO B

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **"Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento global e mosaicismos pigmentares"**

2- PESQUISADOR: **Dra. Leslie Domenici Kulikowski**

CARGO/FUNÇÃO: **Pesquisador**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **56833/01D**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Pediatria**

O seu filho (a) está sendo convidado a participar desse estudo, pois ele apresenta uma doença genética que apresenta manchas pigmentares na pele e atraso de desenvolvimento global. Essa participação é voluntária e se em qualquer momento você não quiser que seu filho participe do estudo, não haverá nenhum prejuízo de atendimento ao seu filho e/ou aos seus familiares na instituição.

Como é uma doença genética é necessário estudar as células para identificar o problema e aumentar o conhecimento da doença, podendo trazer um benefício ao seu filho.

Para identificarmos o problema é será realizado três procedimentos, que são:

(1) Coleta de 4mL de sangue periférico. Esse sangue vai servir para realizar o exame dos cromossomos, de uma forma mais detalhada, e tentar achar a causa da doença do seu filho(a).

(2) Biópsia de pele, que é a retirada de um pequeno pedaço da pele na região das manchas. Esse pedacinho de pele vai servir para realizar também os exames dos cromossomos, de uma forma mais detalhada, e tentar achar a causa da doença do seu filho(a).

(3) Coleta de saliva, onde será coletado a saliva do seu filho, com auxílio de um "cotonete", para realizar um exame dos cromossomos, mas de uma forma mais detalhada, e tentar achar a causa da doença do seu filho(a).

A coleta de sangue pode causar apenas a um desconforto no local durante a coleta devido ao procedimento. E também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma ("roxo") que pode persistir por alguns dias; porém se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

Já a biópsia de pele pode causar também um desconforto e vermelhidão no local devido ao procedimento de retirada de pele.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-2  
HCFMUSP**

Trata-se de um estudo no qual esperamos encontrar pistas sobre a causa e a explicação para as diferenças nos sintomas da doença genética em pacientes com características clínicas distintas, portanto existe uma chance de conseguir um resultado diagnóstico.

Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento que você tem na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser atualizado (a) sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores que se comprometem a utilizar os dados coletados somente para esta pesquisa.

Você não terá despesas pessoais em nenhuma fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não receberá compensação financeira relacionada à sua participação.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

**Você quer ser consultado se o material coletado do seu filho for usado em uma próxima etapa da pesquisa?** ( )Sim ( )Não

Mesmo que não queira ser informado, o material coletado do seu filho só será utilizado com autorização do comitê de ética em pesquisa (CAPpesq- HCFMUSP).

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Dra. Leslie Domenici Kulikowski**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255**, Telefone(s) **2661.9506**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; – e-mail: [cappesq\\_adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq_adm@hc.fm.usp.br).

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-3  
HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **"Investigação citogenômica em pacientes com atraso de desenvolvimento global e mosaïcismo pigmentar"**

Eu discuti com o **Dra. Leslie Domenici Kulikowski** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal                      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha    Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo                      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

## Referências

---

## 9. REFERÊNCIAS

- Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet.* 2011 May;12(5):363-76.
- Ariad D, Yan SM, Victor AR, Barnes FL, Zouves CG, Viotti M, McCoy RC. Haplotype-aware inference of human chromosome abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021 Nov 16;118(46):e2109307118.
- Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet.* 2013 May;14(5):307-20.
- Boettger LM, Handsaker RE, Zody MC, McCarroll SA. Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21.31 region. *Nat Genet.* 2012 Jul 1;44(8):881-5.
- Bursted B, Zamariolli M, Bellucco FT, Melaragno MI. Mechanisms of structural chromosomal rearrangement formation. *Mol Cytogenet.* 2022 Jun 14;15(1):23.
- Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet.* 2015 Jul;31(7):382-92. Erratum in: *Trends Genet.* 2016 Feb;32(2):138.
- Carcavilla A, Suárez-Ortega L, Rodríguez Sánchez A, Gonzalez-Casado I, Ramón-Krauel M, Labarta JI, Quinteiro Gonzalez S, Riaño Galán I, Ezquieta Zubizaray B, López-Siguero JP. Síndrome de Noonan: actualización genética, clínica y de opciones terapéuticas [Noonan syndrome: genetic and clinical update and treatment options]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2020 Jul;93(1):61.e1-61.e14.
- Cao Y, Tokita MJ, Chen ES, Ghosh R, Chen T, Feng Y, Gorman E, Gibellini F, Ward PA, Braxton A, Wang X, Meng L, Xiao R, Bi W, Xia F, Eng CM, Yang Y, Gambin T, Shaw C, Liu P, Stankiewicz P. A clinical survey of mosaic single nucleotide variants in disease-causing genes detected by exome sequencing. *Genome Med.* 2019 Jul 26;11(1):48.
- Carson JC, Hoffner L, Conlin L, Parks WT, Fisher RA, Spinner N, Yatsenko SA, Bonadio J, Surti U. Diploid/triploid mixoploidy: A consequence of asymmetric zygotic segregation of parental genomes. *Am J Med Genet A.* 2018 Dec;176(12):2720-2732.
- Capalbo A, Poli M, Rienzi L, Girardi L, Patassini C, Fabiani M, Cimadomo D, Benini F, Farcomeni A, Cuzzi J, Rubio C, Albani E, Sacchi L, Vaiarelli A, Figliuzzi M, Findikli N, Coban O, Boynukalin FK, Vogel I, Hoffmann E, Livi C, Levi-Setti PE, Ubaldi FM, Simón C. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial. *Am J Hum Genet.* 2021 Dec 2;108(12):2238-2247.
- Chen CP, Chang SY, Lin SP, Chern SR, Wu PS, Chen SW, Lai ST, Chuang TY, Chen WL, Wang W. Array comparative genomic hybridization characterization of



a 3.3-Mb 17p13.3-p13.2 deletion encompassing YWHAE, CRK, HIC1 and PAFAH1B1 in an 8-year-old girl with Miller-Dieker lissencephaly syndrome, congenital heart defects, growth restriction and developmental delay. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018 Oct;57(5):765-768.

Chen X, Li X, Wang P, Liu Y, Zhang Z, Zhao G, Xu H, Zhu J, Qin X, Chen S, Hu L, Kong X. Novel association strategy with copy number variation for identifying new risk Loci of human diseases. *PLoS One*. 2010 Aug 20;5(8):e12185.

Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, Deardorff MA, Krantz ID, Hakonarson H, Spinner NB. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 1;19(7):1263-75.

Conlin LK, Kaur M, Izumi K, Campbell L, Wilkens A, Clark D, Deardorff MA, Zackai EH, Pallister P, Hakonarson H, Spinner NB, Krantz ID. Utility of SNP arrays in detecting, quantifying, and determining meiotic origin of tetrasomy 12p in blood from individuals with Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 Dec;158A(12):3046-53.

Cook EH Jr, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):919-23.

Cooley Coleman JA, Fee T, Bend R, Louie R, Annese F, Stallworth J, Worthington J, Buchanan CB, Everman DB, Skinner S, Friez MJ, Jones JR, Spellacy CJ. Mosaicism of common pathogenic MECP2 variants identified in two males with a clinical diagnosis of Rett syndrome. *Am J Med Genet A*. 2022 Oct;188(10):2988-2998.

Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, Evers JL, Geraedts JP. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2004 Feb;19(2):316-24.

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 Jan;1151:157-66.

Eggermann T, Soellner L, Buiting K, Kotzot D. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends Mol Med*. 2015 Feb;21(2):77-87.

Emanuel BS, Saitta SC. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet*. 2007 Nov;8(11):869-83.

Foulkes WD, Real FX. Many mosaic mutations. *Curr Oncol*. 2013 Apr;20(2):85-7.

Frank J, Happle R. Cutaneous mosaicism: right before our eyes. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1216-9.



Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics*. 2016 Apr;291(2):513-30.

Gasparini Y, Montenegro MM, Novo-Filho GM, Ceroni JRM, Honjo RS, Zanardo ÉA, Dias AT, Nascimento AM, Costa TVMM, Madia FA, Chehimi SN, Damasceno JG, Kim CA, Kulikowski LD. Mosaic Trisomy 12 Associated with Overgrowth Detected in Fibroblast Cell Lines. *Cytogenet Genome Res*. 2019;157(3):153-157.

Golabi M, James AW, Good WV, Cotter PD. Tissue-limited mosaicism for monosomy 13. *Am J Med Genet A*. 2010 Oct;152A(10):2634-9.

Grati FR. Chromosomal Mosaicism in Human Feto-Placental Development: Implications for Prenatal Diagnosis. *J Clin Med*. 2014 Jul 24;3(3):809-37.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008 Nov 3;1(1):4.

Guo H, Jin X, Zhu T, Wang T, Tong P, Tian L, Peng Y, Sun L, Wan A, Chen J, Liu Y, Li Y, Tian Q, Xia L, Zhang L, Pan Y, Lu L, Liu Q, Shen L, Li Y, Xiong W, Li J, Tang B, Feng Y, Zhang X, Zhang Z, Pan Q, Hu Z, Xia K. SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF- $\beta$  pathway in non-syndromic high myopia. *J Med Genet*. 2014 Aug;51(8):518-25.

Huibi X, Kaixun H, Qihua G, Yushan Z, Xiuxian H. Prevention of axial elongation in myopia by the trace element zinc. *Biol Trace Elem Res*. 2001 Jan;79(1):39-47.

Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB, Kutsev SI. Ontogenetic and Pathogenetic Views on Somatic Chromosomal Mosaicism. *Genes (Basel)*. 2019 May 19;10(5):379.

Kawamura R, Kato T, Miyai S, Suzuki F, Naru Y, Kato M, Tanaka K, Nagasaka M, Tsutsumi M, Inagaki H, Ioroi T, Yoshida M, Nao T, Conlin LK, Iijima K, Kurahashi H, Taniguchi-Ikeda M. A case of a parthenogenetic 46,XX/46,XY chimera presenting ambiguous genitalia. *J Hum Genet*. 2020 Aug;65(8):705-709.

Kinsler VA, Boccara O, Fraitag S, Torrelo A, Vabres P, Diociaiuti A. Mosaic abnormalities of the skin: review and guidelines from the European Reference Network for rare skin diseases. *Br J Dermatol*. 2020 Mar;182(3):552-563.

Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, Giannikou K, Syrmou A, Kosma K, Kakourou G, Leze E, Sofocleous C, Kanavakis E, Tzetis M. Microdeletion and microduplication 17q21.31 plus an additional CNV, in patients with intellectual disability, identified by array-CGH. *Gene*. 2012 Jan 15;492(1):319-24.

Kromann AB, Ousager LB, Ali IKM, Aydemir N, Bygum A. Pigmentary mosaicism: a review of original literature and recommendations for future handling. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Mar 5;13(1):39.

Kulikowski LD, Christ LA, Nogueira SI, Brunoni D, Schwartz S, Melaragno MI. Breakpoint mapping in a case of mosaicism with partial monosomy 9p23 --> pter and partial trisomy 1q41 --> qter suggests neo-telomere formation in stabilizing the deleted chromosome. *Am J Med Genet A*. 2006 Jan 1;140(1):82-7.

LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jul;37(13):4181-93.

Lim YH, Moscato Z, Choate KA. Mosaicism in Cutaneous Disorders. *Annu Rev Genet*. 2017 Nov 27;51:123-141.

Lombillo VA, Sybert VP. Mosaicism in cutaneous pigmentation. *Curr Opin Pediatr*. 2005 Aug;17(4):494-500.

Lupski JR. Genetics. Genome mosaicism--one human, multiple genomes. *Science*. 2013 Jul 26;341(6144):358-9.

Natacci F, Alfei E, Tararà L, D'Arrigo S, Zuffardi O, Gentilin B, Pantaleoni C. Chromosome 17q21.31 duplication syndrome: Description of a new familiar case and further delineation of the clinical spectrum. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 Jan;20(1):183-7.

Noor A, Bogatan S, Watkins N, Meschino WS, Stavropoulos DJ. Disruption of YWHAE gene at 17p13.3 causes learning disabilities and brain abnormalities. *Clin Genet*. 2018 Feb;93(2):365-367.

Macé A, Kotalik Z, Valsesia A. Copy Number Variation. *Methods Mol Biol*. 2018; 1793:231-258.

Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010 Nov;12(11):742-5. Erratum in: *Genet Med*. 2020 Dec;22(12):2126.

Martínez-Glez V, Tenorio J, Nevado J, Gordo G, Rodríguez-Laguna L, Feito M, de Lucas R, Pérez-Jurado LA, Ruiz Pérez VL, Torrelo A, Spinner NB, Happle R, Biesecker LG, Lapunzina P. A six-attribute classification of genetic mosaicism. *Genet Med*. 2020 Nov;22(11):1743-1757.

Papavassiliou P, Charalsawadi C, Rafferty K, Jackson-Cook C. Mosaicism for trisomy 21: a review. *Am J Med Genet A*. 2015 Jan;167A(1):26-39.

Pös O, Radvanszky J, Buglyó G, Pös Z, Rusnakova D, Nagy B, Szemes T. DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. *Biomed J*. 2021 Oct;44(5):548-559.

Posey JE, Mohrbacher N, Smith JL, Patel A, Potocki L, Breman AM. Triploidy mosaicism (45,X/68,XX) in an infant presenting with failure to thrive. *Am J Med Genet A*. 2016 Mar;170(3):694-8.

Pyott SM, Pepin MG, Schwarze U, Yang K, Smith G, Byers PH. Recurrence of perinatal lethal osteogenesis imperfecta in sibships: parsing the risk between parental mosaicism for dominant mutations and autosomal recessive inheritance. *Genet Med*. 2011 Feb;13(2):125-30.

Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*. 2020 Feb;22(2):245-257. Erratum in: *Genet Med*. 2021 Nov;23(11):2230.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006 Nov 23;444(7118):444-54.

Sazhenova, E. A., & Lebedev, I. N. (2019). Epigenetic Mosaicism in Genomic Imprinting Disorders. *Russian Journal of Genetics*, 55(10), 1196–1207).

Sekar S, Tomasini L, Proukakis C, Bae T, Manlove L, Jang Y, Scuderi S, Zhou B, Kalyva M, Amiri A, Mariani J, Sedlazeck FJ, Urban AE, Vaccarino FM, Abyzov A. Complex mosaic structural variations in human fetal brains. *Genome Res*. 2020 Dec;30(12):1695-1704.

Sdano MR, Vanzo RJ, Martin MM, Baldwin EE, South ST, Rope AF, Allen WP, Kearney H. Clinical utility of chromosomal microarray analysis of DNA from buccal cells: detection of mosaicism in three patients. *J Genet Couns*. 2014 Dec;23(6):922-7.

Spinner NB, Conlin LK. Mosaicism and clinical genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014 Dec;166C(4):397-405.

Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet*. 2005 Feb;37(2):129-37.

Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome. 2002 Aug 30 [updated 2019 Aug 22]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.

Sund KL, Rehder CW. Detection and reporting of homozygosity associated with consanguinity in the clinical laboratory. *Hum Hered.* 2014;77(1-4):217-24.

Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;25(1):161-79.

Thakur S, Gupta R, Tiwari B, Singh N, Saxena KK. Pallister-Killian syndrome: Review of fetal phenotype. *Clin Genet.* 2019 Jan;95(1):79-84.

Thorpe J, Osei-Owusu IA, Avigdor BE, Tupler R, Pevsner J. Mosaicism in Human Health and Disease. *Annu Rev Genet.* 2020 Nov 23;54:487-510.

Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* 2009 May;15(5):577-83.

Vreeburg M, van Steensel MA. Genodermatoses caused by genetic mosaicism. *Eur J Pediatr.* 2012 Dec;171(12):1725-35.

Wu X, Xie X, Su L, Lin N, Liang B, Guo N, Chen Q, Xu L, Huang H. Prenatal diagnosis of Pallister-Killian syndrome and literature review. *J Cell Mol Med.* 2021 Sep;25(18):8929-8935.

Yousoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet.* 2002 Oct;3(10):748-58.

Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet.* 2000 Jun;66(6):1807-20.

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451-81.

Zhang Q, Yang X, Wang J, Li J, Wu Q, Wen Y, Zhao Y, Zhang X, Yao H, Wu X, Yu S, Wei L, Bao X. Genomic mosaicism in the pathogenesis and inheritance of a Rett syndrome cohort. *Genet Med.* 2019 Jun;21(6):1330-1338.



## APÊNDICE A

Received: 11 March 2022 | Revised: 18 April 2022 | Accepted: 26 April 2022

DOI: 10.1002/bdr2.2047

## CASE REPORT



## The complex search for the cause of gastroschisis

Amanda Brasil de Freitas<sup>1,2</sup> | Rossana Pulcineli Vieira Francisco<sup>1</sup> |  
 Mara Sandra Hoshida<sup>3</sup> | Yanca Gasparini De Oliveira<sup>2</sup> |  
 Leslie Domenici Kulikowski<sup>2</sup> | Maria de Lourdes Brizot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Cytogenomic Laboratory, Department of Pathology, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Obstetric Physiology LIM57, Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

### Correspondence

Maria de Lourdes Brizot, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital das Clínicas Instituto Central, 10 Andar, Sala 10037 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255 Sao Paulo, SP, Brazil, CEP 05403 000. Email: mlbrizot@uol.com.br

### Funding information

This study was supported by grant #2017/17568-0 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP)

### Abstract

**Background:** To reveal the complex etiology of gastroschisis through two independent cases.

**Cases:** Case 1 involves gastroschisis recurrence in a consanguineous marriage, and Case 2 concerns a fetus with gastroschisis whose mother had undergone gastroplasty. Methylation array was carried out in both cases (two fetuses with gastroschisis, their two mothers, one father from the consanguineous marriage), and in 16 controls (fetuses and their respective mothers).

**Conclusion:** The two cases presented different noninherited methylation profiles.

### KEYWORDS

gastroplasty, gastroschisis, methylation array, recurrence

## 1 | INTRODUCTION

In recent decades, a steadily growing rate of gastroschisis in many countries has drawn attention to the causes of the disease other than those of genetic origin, which, in fact, are little known (Feldkamp & Botto, 2008; Mastroiacovo et al., 2006). The studies conducted so far have been controversial regarding the developmental mechanism of gastroschisis (De Vries, 1980; Duhamel, 1963; Johns, 1946; Moore & Stokes, 1953; Rittler et al., 2013; Sadler, 2010; Shaw, 1975). The disease is strongly associated with low maternal age and with exposure to some factors during the periconceptional period—mainly urinary tract infection (UTI), smoking, and regular alcohol consumption (Feldkamp & Botto, 2008; Freitas et al., 2020; Loane et al., 2007). It is a

sporadic birth defect, and family case studies suggest genes contribute to the disease, a hypothesis which is reinforced by co-occurrence in monozygotic twins, siblings, and other relatives (Feldkamp et al., 2007; Kohl et al., 2010; Salinas-Torres et al., 2018; Torfs et al., 1996).

More recent methodologies for genetic variations and gene expression analysis, such as array-MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) and new generation sequencing, have been used to identify genetic changes and biological pathways that converge to form the clinical picture of diseases. We have recently investigated the methylation profile in gastroschisis fetuses to search for the genomic regions possibly involved in the disease's etiology and to analyze the environmental factors to which the pregnant women were exposed (Freitas et al., 2021). In this study, fetuses with gastroschisis

## APÊNDICE B

Received: 24 August 2018 | Revised: 14 July 2019 | Accepted: 7 August 2019

DOI: 10.1002/mgg3.957

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Genetics & Genomic Medicine **Breakpoint delineation in 5p- patients leads to new insights about microcephaly and the typical high-pitched cry**

Samar N. Chehimi<sup>1,2</sup>  | Évelin A. Zanardo<sup>1</sup>  | José R. M. Ceroni<sup>2</sup>  |  
 Amom M. Nascimento<sup>1</sup>  | Fabrícia A. R. Madia<sup>1</sup>  | Alexandre T. Dias<sup>1</sup>  | Gil M. N. Filho<sup>1</sup>  |  
 Marília M. Montenegro<sup>1</sup>  | Jullian Damasceno<sup>1</sup>  | Thaís V. M. M. Costa<sup>1</sup>  |  
 Yanca Gasparini<sup>1</sup>  | Chong A. Kim<sup>2</sup>  | Leslie D. Kulikowski<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

**Correspondence**

Leslie D. Kulikowski, Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Cerqueira César PAMB, 2º andar, Bloco 12, sala 07—CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil.  
 Email: lesliekulik@usp.br

**Funding information**

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo) grants number 2016/09452-0 and FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) grants number FINEP/CT-INFRA-01/2011.

**Abstract**

**Background:** Cri du chat syndrome (CdCS) is a rare syndrome caused by a partial or complete deletion of the short arm of chromosome 5 (5p-). The main clinical features include a high-pitched cry, facial asymmetry, microcephaly, round face at birth, epicanthal folds, hypotonia, delayed growth and development.

**Methods:** We studied 14 Brazilian patients with CdCS using genomic array in order to better define the 5p breakpoints and recognize copy number variations (CNVs) that contribute to clinical manifestations associated with the syndrome.

**Results:** Array confirmed terminal deletions in 13 patients and an interstitial deletion in one patient. It was also possible to map the breakpoints and associate a genomic region of 4.7 Mb to the development of head circumference and cat-like cry. We also found other CNVs concomitant to the 5p deletion including a 9p duplication, a 17q deletion, and a 22q deletion in three different patients.

**Conclusion:** With advancements of molecular cytogenomic methods in the last two decades, it was possible to evidence cryptic alterations and improve the genotype–phenotype correlation. In this work, we describe a new genomic region associated with microcephaly and cat-like cry and highlight the importance of precise delineation of 5p deletion breakpoints and detection of other CNVs in CdCS patients to improve genotype–phenotype correlation to perform a complete clinical and molecular diagnosis.

**KEYWORDS**

Brazilian patients, cri du chat, cytogenomic, genomic array

**1 | INTRODUCTION**

Cri du chat syndrome (CdCS—OMIM #123450) is a genetic disorder caused by total or partial deletion of the

short arm of chromosome 5, also known as 5p- syndrome. Lejeune and colleagues described this syndrome for the first time in 1963 when they noted newborns who presented an abnormal and high-pitched cry, similar to a cat

.....  
 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

*Mol Genet Genomic Med.* 2020;8:e957.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.957>

wileyonlinelibrary.com/journal/mgg3 | 1 of 8








## APÊNDICE C

Received: 28 November 2018 | Revised: 4 November 2019 | Accepted: 6 January 2020  
DOI: 10.1002/mgg3.1133

## CLINICAL REPORT

Molecular Genetics & Genomic Medicine  WILEY

## Gene expression profile suggesting immunological dysregulation in two Brazilian Bloom's syndrome cases

Marília M. Montenegro<sup>1,2</sup>  | Caio R. Quaió<sup>2</sup> | Patricia Palmeira<sup>3</sup> | Yanca Gasparini<sup>1</sup> |  
Andraia Rangel-Santos<sup>3</sup> | Julian Damasceno<sup>1</sup> | Estela M. Novak<sup>4</sup> | Thamires M. Gimenez<sup>5</sup> |  
Guilherme L. Yamamoto<sup>2</sup> | Rachel S. Ronjo<sup>2</sup> | Gil M. Novo-Filho<sup>1,2</sup> | Samar N. Chehimi<sup>1</sup> |  
Evelin A. Zanardo<sup>1</sup> | Alexandre T. Dias<sup>1</sup> | Amom M. Nascimento<sup>1</sup> | Thais V. M. M. Costa<sup>1</sup> |  
Alberto J. da S. Duarte<sup>1</sup>  | Luiz L. Coutinho<sup>6</sup>  | Chong A. Kim<sup>2</sup>  |  
Leslie D. Kulikowski<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Pediatria Clínica, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup>Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Pesquisa Translacional em Oncematologia, Instituto de Tratamento de Câncer Infantil (ITACI), São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Centro de Genômica Funcional, Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ-USP, Piracicaba, Brazil

### Correspondence

Marília Moreira Montenegro, Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.  
Email: mariliammontenegro@gmail.com

### Abstract

**Background:** Bloom syndrome (BS) is a rare autosomal recessive chromosome instability disorder. The main clinical manifestations are growth deficiency, telangiectatic facial erythema, immunodeficiency, and increased risk to develop neoplasias at early age. Cytogenetic test for sister chromatid exchanges (SCEs) is used as a diagnostic marker for BS. In addition, most patients also present mutations in the *BLM* gene, related to defects in the DNA repair mechanism. However, the molecular mechanism behind the pathogenicity of BS is still not completely understood.

**Methods:** We describe two patients confirmed with BS by SCE and molecular analysis. Also, we performed the gene expression profile by the RNA-seq methodology in mRNA transcripts for differential gene expression analysis using as a biological condition for comparison BS versus health controls.

**Results:** We detected 216 differentially expressed genes related to immunological pathways such as positive regulation and activation of B cells, immune effector process and absence of difference of DNA repair genes expression. In addition; we also observed differentially expressed genes associated with apoptosis control, such as *BCL2L1*, *CASP7*, *CDKN1A*, *E2F2*, *IIPR*, *CD274*, *TNFAIP6*, *TNFRSF25*, *TNFRSF13C*, and *TNFRSF17*.

**Conclusion:** Our results suggest that the combination of altered expression of genes involved in signaling pathways of immune response and apoptosis control may contribute directly to the main characteristics observed in BS, such as recurrent infections, growth failure, and high risk of cancer. Transcriptome studies of other instability syndromes could allow a more accurate analysis of the relevant gene interactions associated with the destabilization of the genome. This is a first description of

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.



## APÊNDICE D

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 22, No. 8, August 2020



the Journal of  
Molecular  
Diagnostics  
jmd.amjpathol.org

## Application of Whole-Exome Sequencing in Detecting Copy Number Variants in Patients with Developmental Delay and/or Multiple Congenital Malformations

Check for updates

Évelin A. Zanardo,\* Fabíola P. Monteiro,<sup>1</sup> Samar N. Chehimi,\* Yanca G. Oliveira,\* Alexandre T. Dias,\* Larissa A. Costa,<sup>1</sup> Luiza L. Ramos,<sup>1</sup> Gil M. Novo-Filho,\* Marília M. Montenegro,\* Amom M. Nascimento,\* João P. Kitajima,<sup>1</sup> Fernando Kok,<sup>1,2</sup> and Leslie D. Kulikowski\*

From the Laboratório de Citogenômica,\* Departamento de Patologia, and the Departamento de Neurologia,<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; and the Mendelics Análise Genômica,<sup>1</sup> São Paulo, Brazil

Accepted for publication  
May 7, 2020.

Address correspondence to  
Évelin Aline Zanardo, Ph.D., or  
Leslie Domenici Kulikowski,  
Ph.D., Department of Pathology,  
Laboratório de Citogenômica,  
LIM 03, Faculdade de Medicina,  
Universidade de São Paulo,  
Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar,  
155, 2nd Floor, Block 12,  
São Paulo, SP 05403-000,  
Brazil. E-mail:  
evelinzanardo@usp.br or  
lesliekulik@usp.br.

Overcoming challenges for the unambiguous detection of copy number variations is essential to broaden our understanding of the role of genomic variants in the clinical phenotype. With the improvement of software and databases, whole-exome sequencing quickly can become an excellent strategy in the routine diagnosis of patients with a developmental delay and/or multiple congenital malformations. However, even after a detailed analysis of pathogenic single-nucleotide variants and indels in known disease genes, using whole-exome sequencing, some patients with suspected syndromic conditions are left without a conclusive diagnosis. These negative results could be the result of different factors including nongenetic etiologies, lack of knowledge about the genes that cause different disease phenotypes, or, in some cases, a deletion or duplication of genomic information not routinely detectable by whole-exome sequencing variant calling. Although copy number variant detection is possible using whole-exome sequencing data, such analysis presents significant challenges and cannot yet be used to replace chromosomal arrays for identification of deletions or duplications. (*J Mol Diagn* 2020, 22: 1041–1049; <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.05.007>)

Detection of copy number variations (CNVs) and single-nucleotide variants (SNVs) is essential for cytogenomic diagnosis. Nevertheless, CNV detection using only whole-exome sequencing (WES) data still presents a complex analysis and does not always yield decisive results.<sup>1</sup>

In standard practice, chromosomal microarray is the first-tier clinical test for CNV detection (deletions or duplications larger than approximately 1 kb), as well as uniparental disomy and regions of homozygosity (ROH) in patients with a developmental delay and multiple congenital malformations. This methodology allows quantification of the genome with a high resolution level (average resolution, approximately 10 to 100 kb), depending on the platform, types of probes, and how they are distributed in the genome.<sup>1–4</sup>

Although the chromosomal microarray technique has high resolution and presents probes distributed throughout the genome, even in intronic regions, there is still spacing between them. Thus, the identification of single-nucleotide variants (SNVs) and insertion–deletion mutations (indels), as well as the accuracy in determining the breakpoints of CNVs, are limited.<sup>5,6</sup>

On the other hand, WES analysis allows SNV and indel (nucleotide) detection, even on identification of variants without prior knowledge of the affected gene, diagnosing patients with a suspected phenotype of Mendelian (single-

Supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (finance code 001).

Disclosure: None declared.

## APÊNDICE E

Clinics 77 (2022) 100045

CLINICS

OFFICIAL SCIENTIFIC JOURNAL  
OF FACULDADE DE MEDICINA  
AND HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - SÃO PAULO, BRAZIL

CLINICS

journal homepage: <https://www.journals.elsevier.com/clinics>

## Original articles

## Novel rearrangements between different chromosomes with direct impact on the diagnosis of 5p- syndrome

Samar Nasser Chehimi <sup>a,b,\*</sup>, Vanessa Tavares Almeida <sup>a</sup>, Amom Mendes Nascimento <sup>a,b</sup>,  
Évelin Aline Zanardo <sup>a</sup>, Yanca Gasparini de Oliveira <sup>a</sup>, Gleyson Francisco da Silva Carvalho <sup>a</sup>,  
Beatriz Martins Wolff <sup>a</sup>, Marília Moreira Montenegro <sup>a</sup>, Nilson Antônio de Assunção <sup>c,d</sup>,  
Chong Ae Kim <sup>b</sup>, Leslie Domenici Kulikowski <sup>a,b</sup><sup>a</sup> Laboratório de Citogenética, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brazil<sup>b</sup> Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil<sup>c</sup> Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil<sup>d</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacéuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

## HIGHLIGHTS

- The authors have described three novel rearrangements between chromosomes 5 and 2, 5 and 18, and 5 and Y with chromosomal breakpoints and overlapped phenotypes that were not previously described.
- One of the main atypical features for 5p- syndrome that the authors report was the presence of seizures that was found in the three patients with rearrangements between different chromosomes and in a patient with a deletion followed by duplication in 5p.
- The authors suggest physicians conduct further molecular investigation in the presence of atypical clinical features for patients with 5p- syndrome suspicion.

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Genomic rearrangements  
Microarray  
5p deletion  
Copy number variation

## ABSTRACT

**Objectives:** Copy Number Variations (CNVs) in the human genome account for common populational variations but can also be responsible for genetic syndromes depending on the affected region. Although a deletion in 5p is responsible for a syndrome with highly recognizable phenotypical features, other chromosomal abnormalities might overlap phenotypes, especially considering that most studies in 5p use traditional cytogenetic techniques and not molecular techniques.

**Methods:** The authors have investigated 29 patients with clinical suspicion of 5p- syndrome using Chromosomal Microarray (CMA), and have gathered information on previous tests, clinical signs, symptoms, and development of the patients.

**Results:** The results showed 23 pure terminal deletions, one interstitial deletion, one deletion followed by a 3 Mb duplication in 5p, three cases of 5p deletion concomitant to duplications larger than 20 Mb in chromosomes 2, 9, and 18, and one 5p deletion with a chromosome Y deletion. CMA showed relevant CNVs not typically associated with 5p- that may have contributed to the final phenotype in these patients.

**Conclusion:** The authors have identified three novel rearrangements between chromosomes 5 and 2 (Patient 27), 5 and 18 (Patient 11), and 5 and Y (Patient 22), with breakpoints and overlapped phenotypes that were not previously described. The authors also highlight the need for further molecular investigation using CMA, in different chromosomes beyond chromosome 5 (since those cases did not show only the typical deletion expected for the 5p- syndrome) to explain discordant chromosomal features and overlapped phenotypes to unravel the cause of the syndrome in atypical cases.

\*Corresponding author.

E-mail address: [nchsamar@gmail.com](mailto:nchsamar@gmail.com) (S.N. Chehimi).<https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2022.100045>

Received 13 July 2021; Accepted 26 January 2022

1807-5932/© 2022 HCFMUSP. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## APÊNDICE F

Molecular  
Syndromology

Novel Insights from Clinical Practice

Mol Syndromol  
DOI: 10.1159/000524371Received: March 23, 2021  
Accepted: March 29, 2022  
Published online: May 18, 2022**Cri-du-Chat Syndrome: Revealing  
a Familial Atypical Deletion in 5p**Vanessa T. Almeida<sup>a</sup> Samar N. Chehimi<sup>a</sup> Yanca Gasparini<sup>a</sup>  
Amom M. Nascimento<sup>a</sup> Gleyson F.S. Carvalho<sup>a</sup> Marília M. Montenegro<sup>a</sup>  
Évelin Aline Zanardo<sup>a</sup> Alexandre T. Dias<sup>a</sup> Nilson A. Assunção<sup>b</sup>  
Chong A. Kim<sup>c</sup> Leslie D. Kulikowski<sup>a</sup><sup>a</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>c</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil**Established Facts**

- The main clinical feature of cri-du-chat syndrome (CdCS) is the high-pitched cat-like cry in newborns.
- Karyotype analysis is the only test available for most Brazilian patients with clinical manifestations of CdCS.

**Novel Insights**

- We report the investigation of a familial 6.2-Mb atypical deletion in 5p.
- We highlight the importance of performing cytogenomic tests for precise delineation of 5p deletion breakpoints to improve genotype-phenotype correlation.

**Keywords**Cri-du-chat syndrome · Familial deletion · Multiplex  
ligation-dependent probe amplification · Array**Abstract****Introduction:** Cri-du-chat syndrome is generally diagnosed when patients present a high-pitched cry at birth, microcephaly, ocular hypertelorism, and prominent nasal bridge.The karyotype is useful to confirm deletions in the short arm of chromosome 5 (5p-) greater than 10 Mb. In cases of smaller deletions, it is necessary to resort to other molecular techniques such as fluorescence in situ hybridization, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or genomic array. **Case Presentation:** We report a family with an atypical deletion in 5p (mother and 2 children) and variable phenotypes compared with the literature. We applied a P064 MLPA kit to evaluate 5p- in the mother and the 2 children, and weKarger@karger.com  
www.karger.com/msy

© 2022 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:  
Vanessa T. Almeida, vanessatavaress@usp.br

Karger