

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA-MOLECULAR DE MICRODELEÇÕES
CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS A DOENÇAS GENÔMICAS

Natália Barcellos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul para obtenção do título de
Mestre

Porto Alegre, fevereiro de 2013

Agradecimentos

A Deus, que é o meu orientador divino, e que me guia nesses caminhos, nem sempre fáceis, porém necessários de serem perseguidos como parte do meu crescimento espiritual e pessoal.

A minha co-orientadora, Dr^a Mariluce Riegel, uma pesquisadora exemplar, pela confiança depositada em mim, pela motivação e disponibilidade durante a realização desse trabalho, paciência, respeito, carinho e competência.

Ao meu orientador Prof. Roberto Giugliani, pela confiança e respeito.

Ao Dr. Sharbel Maluf, pela introdução à citogenética e conhecimentos transmitidos, pela atenção e compreensão.

Aos meus pais Antônio Carlos e Viviane, que apesar de situação difícil que enfrentamos sempre me apoiaram e nunca permitiram que eu desistisse dos meus sonhos.

A minha irmã Betina, simplesmente por existir e ser minha melhor amiga.

Aos meus avós Dirceu e Sulani, por serem as razões da minha vida.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de fraqueza e felicidade.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica do HCPA, onde minha carreira profissional começou e onde todos de alguma forma fizeram parte do meu crescimento.

A todos que, de alguma forma não se encontram aqui citados, mas que possuem minha consideração e reconhecimento para este estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/ Processo 402012/2010-0

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG 10-560

“A imaginação é muito mais importante que o conhecimento”.

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Durante as últimas décadas, a utilização de métodos moleculares como Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e Hibridização Genômica Comparativa (array-CGH) mudou dramaticamente a perspectiva em relação à detecção de rearranjos genômicos submicroscópicos. O número de doenças identificadas como causada por microdeleções/microduplicações cromossômicas aumentou rapidamente, trazendo um papel crucial para a citogenética no diagnóstico destas condições. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar microdeleções cromossômicas associadas a síndromes de malformações em um laboratório de citogenética de referência de um hospital público do sul do Brasil. **Métodos:** Estudo retrospectivo e prospectivo, em uma série consecutiva de amostras. O estudo foi baseado em registros hospitalares e laboratoriais de amostras de uma coorte de pacientes com suspeita clínica de microdeleção cromossômica. Foram selecionadas amostras de indivíduos em que o diagnóstico clínico proposto incluía uma suspeita de rearranjo nos cromossomos 4p16.3, 5p15.2, 5q35, 7q11.23, 8q24.12, 15q11-q12, 16p13.3, 17p13.3, 17p11.2, 2,2 e 22q11 que foram analisados por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Em 11 amostras com microdeleções, hibridização genômica comparativa (array-CGH) foi realizada. **Resultados:** Um total de 504 amostras foram avaliadas, sendo as suspeitas mais comuns a deleção 22q11.2 (29,5%), a síndrome de Prader-Willi (21,6%), a síndrome de Williams-Beuren (15%) e da síndrome de Angelman (13%). Em 120 deles (23,8%) desequilíbrios cromossômicas relacionadas com o diagnóstico clínico foram encontrados. A del7q11.23 foi a alteração mais frequente (8,5%) detectada, seguida por del22q11.2 (5,3%) e del15q11-q12 (4,5%). **Conclusões:** Nossos achados reforçam a estratégia de que um teste de citogenética molecular sensível associada com uma avaliação clínico qualificado são cruciais para a detecção e caracterização precisa de deleções cromossômicas submicroscópicas. Além disso, nosso estudo enfatiza a necessidade de educação continuada para o desenvolvimento e utilização de novas tecnologias para o diagnóstico citogenético, as quais, em nossa experiência, puderam ser introduzidas com sucesso em um hospital público do sul do Brasil.

Palavras-chave: microdeleção cromossômica, FISH, array-CGH, síndrome de microdeleção, citogenética molecular

ABSTRACT

Background: During the past decades, the widespread use of FISH and microarray-based technologies dramatically changed our perspective regarding detection of submicroscopic genomic rearrangements. The number of diseases identified as caused by chromosomal microdeletions/microduplications increased quickly, bringing a new and crucial role for cytogenetics in the diagnosis of these conditions. **Objective:** The purpose of this study was to identify and characterize chromosomal microdeletions associated with malformation syndromes in a reference cytogenetics laboratory from a public hospital of Southern Brazil. **Methods:** Using retrospective and prospective approaches, we evaluated a consecutive series of samples. The study was based in hospital and laboratorial records of samples from a cohort of subjects with clinical suspicion of a chromosomal microdeletion. We selected samples from subjects in whom a clinical diagnosis was proposed, which included deletion of chromosomes 4p16.3, 5p15.2, 5q35, 7q11.23, 8q24.12, 15q11-q12, 16p13.3, 17p13.3, 17p11.2,2 and 22q11 identified by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. In 11 samples with microdeletions, array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) was performed. **Results:** A total of 504 samples were evaluated, being the most common suspicions the 22q11.2 deletion (29.5%), the Prader-Willi syndrome (21.6%), the Williams-Beuren syndrome (15%) and the Angelman syndrome (13%). In 120 of them (23.8%) chromosomal imbalances related to the clinical diagnosis were found. The deletion 7q11.23 was the most frequently finding (8.5%), followed by del22q11.2 (5.3%) and del15q11-q12 (4.5%). **Conclusions:** Our findings provide support to the idea that a sensitive molecular cytogenetic test associated with a qualified clinical evaluation are crucial for the detection and precise characterization of submicroscopic chromosome deletions. Additionally, our study emphasizes the need of continuing

education for the improvement of the cytogenetic diagnosis technology, which was successfully introduced in a public hospital of Southern Brazil.

Key words: chromosomal microdeletion, FISH, array-CGH, microdeletion syndrome, molecular cytogenetics

JUSTIFICATIVA

As alterações cromossômicas constituem uma importante categoria de doenças genômicas que resultam de uma perda ou ganho de material genético devido a rearranjos genômicos. Rearranjos cromossômicos originam doenças genômicas quando levam a alterações na dosagem ou interferem com a regulação de gene (s) haploinsuficientes, por fusão gênica, efeito de posição, exposição de genes recessivos ou polimorfismos funcionais, e outros mecanismos. As doenças genômicas mais frequentes e melhor caracterizadas estão divididas em duas categorias: aquelas resultantes da perda de material genético (deleção) e aquelas resultantes do ganho de material genético (duplicação). Várias microdeleções cromossômicas estão associadas a doenças genômicas. No Brasil, embora alguns grupos tenham pesquisado e publicado dados referentes a algumas dessas condições isoladamente, a maioria dos serviços de genética médica públicos ainda enfrenta dificuldades em estudar essas doenças em seu conjunto por não contar com especialistas competentes na área e a capacidade laboratorial necessária. Além de contribuir com informações referentes ao mecanismo de origem e formação das microdeleções cromossômicas, o desenvolvimento desse projeto permitiu a identificação e classificação citogenética-molecular de rearranjos cromossômicos em amostras de indivíduos portadores que ainda permaneciam sem um diagnóstico citogenético preciso.

A realização deste trabalho acrescentou dados para informação e diagnóstico de síndromes de microdeleção em um hospital de referência. Propiciou ainda um programa de treinamento de pessoal através da capacitação técnica da candidata ao título de mestre vinculada ao projeto e oportunizou um estudo colaborativo entre instituições acadêmicas a nível nacional, multiplicando benefícios, com impacto direto na pesquisa e assistência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cariótipo com bandas GTG de alta resolução	16
Figura 2. Exemplos de tipos de sondas de DNA utilizadas em FISH	20
Figura 3. Esquema das principais etapas do método de <i>array</i> CGH	23
Figura 4. Perfil de microdeleção observado pelo método de <i>array</i> -CGH	24
Figura 5. Aspecto clínico e FISH de microdeleção cromossômica	40

LISTA DE ABREVIATURAS

22qDS	Síndrome de Deleção 22
AS	Síndrome de Angelman
BAC	Cromossomo Artificial de Bactéria
CBP	CREB-binding protein
CNV	Variação do Número de Cópias
Cy3 dCTP	Deoxidina Trifosfato Cianina-3
Cy5 dCTP-	Deoxidina Trifosfato Cianina-5
Del	Deleção
Dup	Duplicação
DGS	Síndrome de DiGeorge
DNA	Acido Desoxirribonucléico
ELN	Elastina
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
FoSTeS	<i>Fork Stalling and Template Switching</i>
CGH	Hibridização Genômica Comparativa
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana
Kb	Quilobase
LCR	Baixa Repetição de Cópia
LETM1	<i>Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1</i>
LGS	Síndrome de Langer-Giedion
LIMK1	<i>LIM domain kinase 1</i>
LIS1	<i>Associated Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia</i>
Mb	Megabase (1 milhão de pares de base)
MDS	Síndrome de Miller-Dieker
NAHR	<i>Nonalelic Homologous Recombination</i>

NHEJ	<i>Nonhomologous End-Joining</i>
NSD1	<i>NSD1 nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAC	Cromossomo artificial derivado P1
PAFAH1B1	= <i>LIS1</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PWS	Síndrome de Prader-Willi
RAI1	<i>Retinoic Acid Induced 1</i>
RNA	Acido Ribonucléico
RTS	Síndrome de Rubinstein-Taybi
SKY	Cariótipo espectral
SMS	Síndrome de Smith Magenis
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNRPN	Pequena proteína ribonucleica polipeptídeo N
SoS	Síndrome de Sotos
TUPLE1	<i>Tup-like enhancer of split gene-1 ou degradation –like</i>
TRPS	Síndrome Tricorrinofalangeana
VCFS	Síndrome Velocardiofacial
WHS	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
WHSCR1	Região crítica-1 da síndrome de Wolf-Hirschhorn
WHSCR2	Região crítica-2 da síndrome de Wolf-Hirschhorn
WBS	Síndrome de Williams-Beuren
YAC	Cromossomo Artificial de Levedura

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão da literatura	13
2.1 Estudo dos cromossomos em humanos	13
2.2 O método de Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	16
2.3 O método de <i>array</i> -CGH	20
2.4 Variação no número de cópias (CNV) e doenças genômicas	25
2.5 Mecanismos de origem de rearranjos no genoma	26
2.6 Microdeleções cromossômicas associadas à síndromes de microdeleção ou síndrome de genes contíguos.	27
2.6.1 Microdeleções cromossômicas recorrentes	28
2.6.2 Microdeleções cromossômicas não recorrentes	36
3 Objetivos	41
3.1 Objetivo principal	41
3.2 Objetivos secundários	41
4 Referências bibliográficas da revisão	42
5 Artigo em inglês	56
6 Considerações finais	75
7 Apêndices	80
8 Anexos	84

1. INTRODUÇÃO

O mapeamento genético é frequentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlação entre alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias apresentando vários indivíduos afetados. Na primeira abordagem, a presença de alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra em que deu-se o início de uma alteração, levando a perda (deleção) ou ganho (duplicação) de segmentos, possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a condição observada.

A análise cromossômica de rotina, ou cariótipo, tem sido usada por mais de 50 anos como investigação padrão em indivíduos com suspeita de cromossomopatias, com deficiência intelectual e múltiplas malformações congênitas e dismorfias de causa desconhecida. A análise e o estudo dos cromossomos através do cariótipo com bandeamento possibilitaram a descoberta de vários genes associados a uma série de distúrbios genéticos. Porém, uma importante limitação dessa técnica é a impossibilidade de detectar rearranjos cromossômicos menores que 4-6 Mb. (dependendo da resolução do bandeamento cromossômico). Por esse motivo, foram desenvolvidas e têm sido utilizadas técnicas que utilizam instrumentos da biologia molecular aplicadas a citogenética para a análise e estudo de diversas alterações cromossômicas.

A utilização de métodos como Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e Hibridização Genômica Comparativa (*array*-CGH) permite uma melhor detecção e caracterização dos mecanismos de formação de anomalias cromossômicas em humanos. Como consequência, tem ocorrido uma melhoria na capacidade de diagnóstico e desenvolvimento de pesquisa em citogenética pré-natal e pós-natal. Esse fato tem contribuído para a um melhor entendimento de quadros clínicos específicos e para o conhecimento em relação à patologia das doenças genéticas causadas por alterações cromossômicas. Os distúrbios genômicos em decorrência de alterações cromossômicas mais comuns e melhor delineados, são divididos em duas categorias principais: aqueles decorrentes da perda de material cromossômico/DNA (síndromes de deleção) e aqueles decorrentes do ganho de material cromossômico/DNA (síndromes de duplicação).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estudo dos cromossomos em humanos

A Citogenética Humana teve início com os trabalhos de Fleming em 1879 e de Arnold, em 1882, que primeiramente observaram cromossomos mitóticos humanos. A partir daí, surgiram vários trabalhos que procuraram estimar o número de cromossomos humanos, dentro dos quais se destaca o de Painter, em 1923, que descreveu que o cariótipo humano continha 48 cromossomos. Outros relatos confirmaram esse número. As limitações técnicas, como o uso de cortes histológicos e a dificuldade para analisar cromossomos sobrepostos ou aglomerados fizeram com que essa estimativa permanecesse válida por três décadas. Em 1956, devido à combinação de solução hipotônica e colchicina na preparação cromossômica, Tjio e Levan obtiveram preparações metafásicas melhores e estimaram como 46 o número de cromossomos em fibroblastos de pulmão. Esses resultados abriram o caminho para o desenvolvimento da citogenética humana e para os primeiros relatos de cariótipos humanos anormais. Em 1959, Lejeune e col., descreveram a presença de um cromossomo pequeno adicional no cariótipo de nove crianças com síndrome de Down, definindo a trissomia do cromossomo 21. Os trabalhos subsequentes descreveram anormalidades de número de cromossomos sexuais, especificamente, a presença de um cromossomo X extranumerário na síndrome de Klinefelter (Jacobs e Strong, 1959) e o cariótipo com 45 cromossomos, contendo apenas um cromossomo X, na síndrome de Turner (Ford e col., 1959).

Em 1960, Nowell descobriu que a fitohemaglutinina (PHA) estimulava a divisão de linfócitos em cultura. Esse achado adicional permitiu a Moorhead e col. (1960) descreverem o método de preparo de cromossomos combinando culturas de linfócitos contendo PHA e acúmulo e espalhamento dos cromossomos em metáfase com o uso de colchicina e solução hipotônica respectivamente, seguidos por fixação com metanol-ácido acético e coloração Giemsa. Ainda em 1960, Nowell e Hungerford descreveram um cromossomo minúsculo (cromossomo Philadelphia) em leucemia mielóide crônica (LCM) (Nowell, Hunerford, 1960), demonstrado por Rowley em 1973 ser resultante de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22.

Em 1968, Caspersson e col., demonstraram que cada cromossomo apresentava um padrão distinto de bandas após a coloração fluorescente com mostarda de quinacrina (banda Q). Outros métodos para obtenção de bandas foram descritos subsequentemente. A banda G, em que emprega digestão com tripsina seguida de coloração com Giemsa, não requer fluorescência e é ainda o procedimento padrão utilizado no diagnóstico clínico. As bandas R (reversas) são decorrentes de uma desnaturação controlada por aquecimento, e têm o padrão “negativo” da banda G. As bandas C revelam a presença de heterocromatina constitutiva e estão situadas, sobretudo, nas regiões pericentroméricas dos cromossomos humanos, mais acentuadamente na região pericentromérica dos cromossomo 1,9,16 e braço longo do Y. Em 1976, Yunis descreveu um método para estudar os cromossomos humanos em alta resolução (>550 bandas), usando preparações prometafásicas, quando os cromossomos estão apenas na fase inicial de condensação, permitindo descrever anormalidades raras e sutis do genoma humano.

Com o desenvolvimento das técnicas de bandas e de maior resolução tornou-se possível identificar algumas anormalidades cromossômicas estruturais associadas a fenótipos característicos e resultantes de desequilíbrio de dosagem de segmentos cromossômicos específicos. Síndromes de múltiplas malformações causadas por deleções ou duplicações de regiões genômicas têm sido identificadas em indivíduos portadores de alterações cromossômicas em desequilíbrio.

A análise microscópica dos cromossomos tem sido o padrão ouro para o estudo das anomalias cromossômicas desde o desenvolvimento da técnica de bandamento G no final da década de 60. As técnicas convencionais atuais de cariotipagem por coloração e bandamento de células em divisão, são capazes de detectar alterações cromossômicas estruturais que tenham até 4-5 milhões de pares de base de DNA (4-5 Mb) dependendo da condensação dos cromossomos e da qualidade das metáfases. Essa medida corresponde ao poder de resolução do método em detectar uma banda cromossômica, sendo o nível de resolução de uma técnica citogenética determinado pelo número de bandas visíveis. As bases moleculares do bandamento envolvem a composição de bases (nucleotídeos), proteínas e a organização funcional do genoma. A observação do padrão de bandas de um cromossomo permite também a identificação de pontos de referência dentro dos mesmos, que são áreas com características morfológicas marcantes e

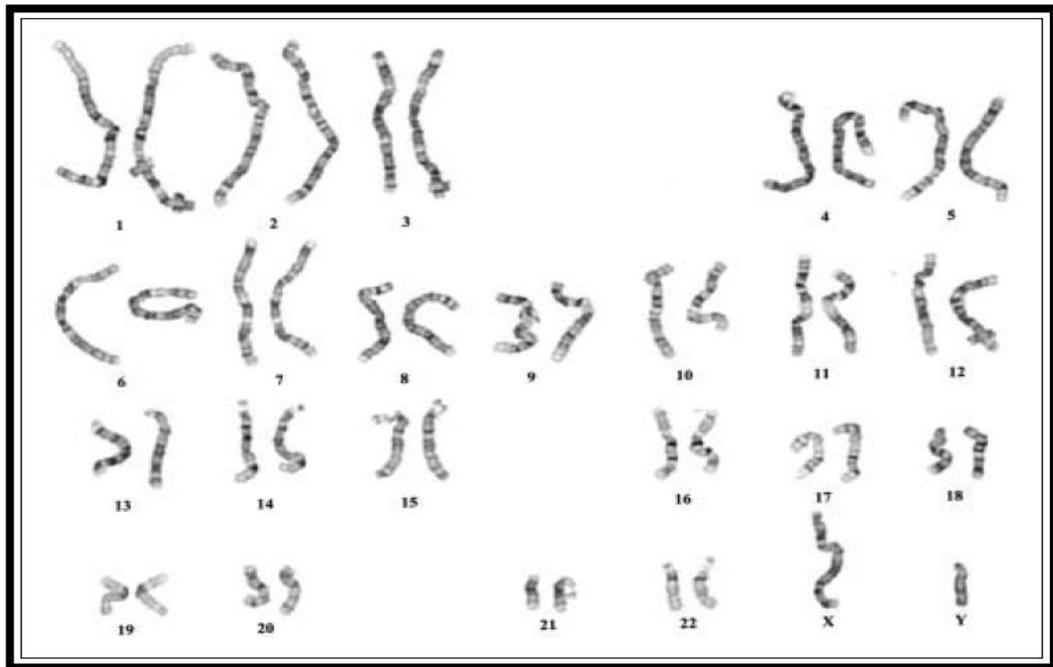
distintas, que ajudam na identificação do cromossomo e de suas regiões (rev. Maluf e Riegel, 2011).

Com as técnicas de bandas e de maior resolução (800 a 2.000 bandas) tornou-se possível identificar algumas anormalidades cromossômicas estruturais associadas a fenótipos característicos e resultantes de desequilíbrio de dosagem de segmentos cromossômicos específicos. Quadros clínicos de múltiplas malformações causadas por deleções ou duplicações de regiões genômicas têm sido identificados em indivíduos com alterações cromossômicas. Em situações especiais pode-se indicar o bandamento de alta resolução, em que são analisados os cromossomos durante a prófase ou prometáfase (Figura 1).

A análise cromossômica por bandamento permanece como um dos exames genéticos mais comuns e acessíveis realizados para diagnóstico, tanto na área de genética, pediatria e oncologia como na de medicina fetal. Porém, esse método apresenta várias limitações. As técnicas de citogenética clássica, baseadas em bandamentos cromossômicos, permitem o diagnóstico de alterações cromossômicas estruturais como a identificação de deleções, inversões, inserções, translocações e outros rearranjos cromossômicos. No entanto, muitas aberrações estruturais, como pequenas deleções e duplicações menores do que 4 a 5 Mb e rearranjos cromossômicos complexos, não são possíveis de serem identificadas ou bem caracterizadas. Além disso, os procedimentos citogenéticos clássicos necessitam de cromossomos em metáfase, ficando limitados a certas células e tecidos.

No final da década de 80, o estudo de cromossomos em humano foi muito beneficiado pelo desenvolvimento de métodos fluorescentes não isotópicos de hibridização *in situ* (FISH), que permitem a detecção de alterações submicroscópicas (Pinkel e col., 1986).

Figura 1. Cariótipo com bandas GTG de alta resolução.



Fonte: Imagem cedida por Dra. Mariluce Riegel, Serviço de Genética Médica, HCPA.

2.2 O método de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

FISH é um procedimento citoquímico o qual permite verificar e detectar sequências de ácidos nucleicos específicas em células metafásicas e interfásicas. A técnica é baseada na formação de um híbrido entre sequências de DNA ou regiões específicas presentes nas células ou em cromossomos de preparações citológicas e sondas de DNA marcadas. O híbrido formado pode ser observado diretamente ao microscópio, ou após uma marcação imunocitoquímica com fluorocromos de anticorpos específicos (Pinkel e col., 1986).

Essa técnica se fundamenta nos estudos pioneiros de Gall e Pardue (1969), os quais envolviam a formação e detecção de híbridos de RNA-DNA para a identificação dos genes de RNAr marcados radioativamente em cortes histológicos de tecidos de *Xenopus* através de auto-radiografia. As técnicas utilizando híbridos DNA-DNA com preparações cromossômicas logo se seguiram, mas a abordagem inicial permanece.

Para evitar o uso de radioisótopos, Pinkel e col. (1986) desenvolveram um sistema de hibridização *in situ* utilizando fluorocromos para a detecção das reações de

hibridização, técnica que ficou conhecida como técnica de FISH, sigla em inglês para *Fluorescent in situ Hybridization*. Nessa técnica, utilizam-se sondas específicas para certas regiões cromossômicas marcadas com fluorocromos. A hibridização pode ser realizada em cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras cromossômicas estendidas ou, mais recentemente, em microarranjos (*arrays*) de DNA. Amostras de diferentes origens podem ser analisadas: amostras pós-natais (sangue, pele, medula óssea, linfonodos, tumores sólidos), amostras pré-natais (amostras de vilosidades coriônicas, de líquido amniótico ou sangue fetal) e de embriões pré-implantação (uma célula do blastocisto).

O desenvolvimento da citogenética utilizando instrumentos da biologia molecular aumentou a capacidade de diagnóstico pré-natal e pós-natal em relação à detecção e melhor caracterização de síndromes causadas por alterações cromossômicas em humanos. A aplicação de técnicas citogenéticas que utilizam ferramentas moleculares têm permitido: 1) a identificação de anormalidades cromossômicas previamente descritas, particularmente cromossomos extras e duplicações *de novo*, as quais, com os métodos de bandamento citogenético, não poderiam ser caracterizadas; 2) a detecção de microdeleções e duplicações ao nível de gene e 3) a contribuição para o mapeamento gênico em combinação com várias alterações como, por exemplo, identificação de síndromes causadas por microdeleções e microduplicações (Schinzel e col., 2003; Vissers e Stankiewicz 2012).

O princípio do método de FISH baseia-se na utilização de sondas de DNA contendo dois elementos, um denominado inserto (i.e., o DNA humano complementar à sequência alvo no cromossomo) e o vetor (i.e., uma sequência de DNA não relacionada na qual o inserto será clonado e através do qual o DNA poderá ser replicado). As sondas são fragmentos de DNA genômico capazes de se ligarem à suas cadeias complementares, produzindo um sinal fluorescente quando ocorre hibridização. As preparações citogenéticas são realizadas através de procedimentos citogenéticos de rotina. O DNA cromossômico e o da sonda são desnaturados e colocados em temperatura adequada para haver hibridização. Se houver complementaridade das bases da sonda e do DNA alvo, haverá hibridização, à qual é identificada através dos fluorocromos utilizados para a marcação da sonda. A hibridização da sonda ao DNA alvo é observada em microscópio de fluorescência. Dado o número de sondas e

fluorocromos que existem, é possível a marcação múltipla (i.e., a hibridização simultânea e detecção de duas ou mais sondas na mesma preparação citológica).

No FISH, segmentos relativamente grandes de DNA humano (>40 kb) são clonados em uma variedade de vetores, como cosmídeos, cromossomos bacterianos artificiais (BAC's), cromossomos artificiais derivados de P1 – (PAC's) ou cromossomos de levedura artificiais (YAC's), marcados e usados como sonda para hibridar com regiões cromossômicas humanas de sequências complementares. O FISH utiliza mais frequentemente amplas sequências de DNA (aproximadamente 50 a 100 kb) para identificar regiões específicas do genoma (van Ommen e col., 1995).

Atualmente, existe uma variedade de tipos de sondas que podem ser utilizadas por FISH para investigar cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos específicos do genoma, sendo três as mais utilizadas em citogenética humana (Figura 2). As sondas de DNA alfa-satélite, presente nos centrômeros de todos os cromossomos, contém repetições em *tandem* de sequências de DNA. Essas sequências demonstram 20-40% de divergência umas das outras de forma que existem sondas específicas para quase todos os centrômeros dos cromossomos humanos. As sondas centroméricas apresentam sinais intensos de fluorescência e podem ser utilizadas em diferentes aplicações como para a detecção de aneuploidias, determinação do sexo em núcleos interfásicos, detecção da origem de cromossomos marcadores ou em anel, enumeração cromossômica em amostras pré-implantação e pré-natais, enumeração de tumores sólidos e em doenças hematológicas. Algumas sondas são utilizadas em conjunto, como as sondas para a detecção das trissomias 13, 18, e 21 e das alterações numéricas dos cromossomos sexuais X e Y, utilizadas principalmente em exames pré-natais e pré-implantação, como em amniócitos não cultivados e em blastômeros de embriões. As sondas de sequência única repetitiva para centrômero possibilitam identificar o número de cópias de cromossomos específicos ou a origem de pequenos cromossomos supranumerários (marcadores).

As sondas de DNA de sequência única são úteis para a identificação de regiões genômicas específicas como, por exemplo, a deleção 22q11.2 na síndrome de DiGeorge, a deleção 7q11.23 na síndrome de Williams-Beuren e a deleção 15q11.2-q13 na síndrome de Prader-Willi, entre outras. Para a detecção de microdeleções, são utilizadas simultaneamente duas sondas marcadas com fluorocromos de diferentes

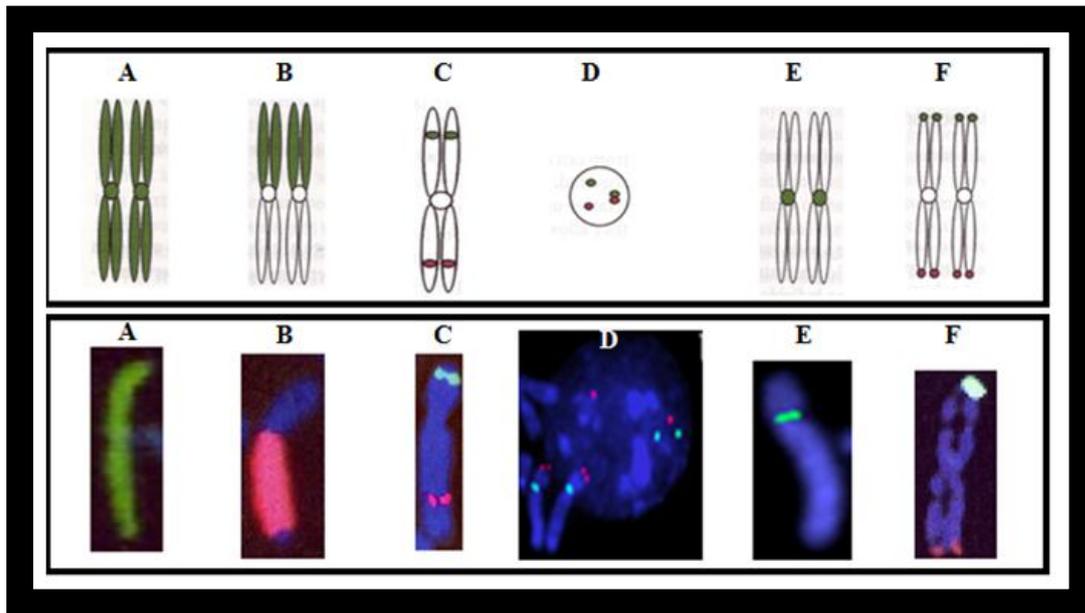
cores: uma sonda específica para a região comumente deletada na síndrome e uma sonda controle, específica para outra região do mesmo cromossomo. Sondagens de sequência única subteloméricas são utilizadas para detectar rearranjos crípticos envolvendo as regiões terminais dos cromossomos.

Deleções no limiar (4 a 5 Mb) ou abaixo do nível de detecção por bandamento citogenético clássico são caracterizadas como microdeleções. Embora deleções clássicas como as que envolvem a região crítica em 4p16.3 (síndrome de Wolf-Hirschhorn) e 5p15.2 (síndrome de Cri-du-Chat) seja possível de se detectarem através do cariótipo, sabe-se que existem vários casos com manifestação clínica de deleção 4p16.3, por exemplo, em que o cariótipo não detecta a deleção. Provavelmente devido à existência de uma variabilidade no tamanho das deleções em certas regiões, microrrearranjos dentro dessa região não podem ser reconhecidos e/ou caracterizados utilizando-se apenas de técnicas de citogenética clássica.

A introdução de técnicas citogenéticas moleculares, que teve início com o desenvolvimento do método de FISH, trouxe um grande avanço na detecção e identificação de rearranjos cromossômicos e elucidou as bases citogenéticas de microrearranjos cromossômicos. Esse fato tem permitido uma melhor caracterização de alterações cromossômicas previamente descritas e a detecção de novas microdeleções e microduplicações genômicas. Entretanto, o método de FISH requer um conhecimento específico da região a ser investigada e, na maioria das situações, depende de um diagnóstico clínico.

A otimização do método de hibridação *in situ* resultou no desenvolvimento de diferentes técnicas baseadas no princípio do FISH, entre elas o cariótipo espectral (SKY) (Liyanage e col., 1996; Schröck e col., 1997) e o FISH multicolor (m-FISH) (Uhrig e col., 1999). Nesses métodos, a combinação de fluorocromos permite identificar cada um dos 23 pares de cromossomos simultaneamente. Outra abordagem no estudo de alterações cromossômicas, baseada nesse mesmo princípio, é a Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization – CGH*), que foi desenvolvida como método de rastreamento genômico amplo, na tentativa de se identificar desequilíbrios no número de cópias de seqüências de DNA.

Figura 2. Exemplos de tipos de sondas de DNA utilizadas em FISH.



A: Sondas de biblioteca de DNA (“pintura cromossômica”). B: Sondas de biblioteca de DNA para um braço cromossômico (“pintura cromossômica parcial”). C: Sondas *locus* específicas. Região crítica da síndrome de Cri-du-Chat (5p15.2, verde) e sonda controle (5q31, vermelho). D: Sonda *locus* específica em intérfase e metáfase. Região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16.3, vermelho) e sonda controle (4p11.1-q11.1, verde). E: Sonda centromérica do cromossomo 4. F: Sondas subtelo méricas do cromossomo 3, braço curto (verde) e braço longo (vermelho) (Fonte: Figura cedida por Dra. Mariluce Riegel, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

2.3 O método de Hibridização Genômica Comparativa baseado em microarranjos (*array*-CGH)

A análise de DNA através de *array*-CGH também tem sido denominada, por alguns autores, de “cariótipo molecular” (Vermeesch e col., 2007). *Array*-CGH é uma técnica que permite investigar perdas e ganhos de sequências de DNA no genoma inteiro. O uso desta tecnologia tem possibilitado o diagnóstico molecular de alterações cromossômicas submicroscópicas previamente não detectadas, principalmente em indivíduos com deficiência intelectual e/ou múltiplas malformações congênicas de causa desconhecida. Através do *array*-CGH tem sido possível o delineamento de novas

síndromes e o mapeamento de genes envolvidos na etiologia de várias condições clínicas. A possibilidade de realização de um cariótipo molecular através de *array*-CGH permite a detecção de variação do número de cópias de DNA ao longo do genoma em uma única análise. Esta possibilidade aumentou consideravelmente a detecção de rearranjos cromossômicos em desequilíbrio no genoma.

Desenvolvida em 1992, a técnica de CGH consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes. A técnica original utilizava metáfases normais fixadas em lâmina e é conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional (Kallioniemi e col., 1992). Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e utilizando a tecnologia de microarranjos (*microarrays* ou *arrays*) (Solinas-Toldo e col., 1997; Pinkel e col., 1998), foi possível o desenvolvimento de uma metodologia de análise genômica comparativa, agora baseada em microarranjos, conhecida como *array*-CGH. Basicamente, a técnica utiliza vários fragmentos pré-selecionados de DNA anexados, de forma *loci*-específica em uma superfície (lâmina de vidro ou polipropileno). No método de *array*-CGH, utiliza-se como alvo de hibridação, em lugar de cromossomos metafásicos, um conjunto de sondas organizadas em alta densidade.

Os primeiros *arrays* foram construídos com plataformas de cosmídeos (Solinas-Toldo e col., 1997), substituídos em seguida por BACs (Pinkel e col., 1998). Devido ao grande tamanho das sondas, esses *arrays* possuem grande sensibilidade e os resultados puderam ser validados pelos métodos de FISH ou PCR. Porém, a produção de DNA de BACs é trabalhosa e a resolução limitada ao tamanho dos insertos, em geral ao redor de 100-120 Kb. Os *arrays* de oligonucleotídeos (Albertson e Pinkel, 2003) e SNPs têm possibilitado uma cobertura com maior resolução e abrangência do genoma humano (Shaikh, 2007).

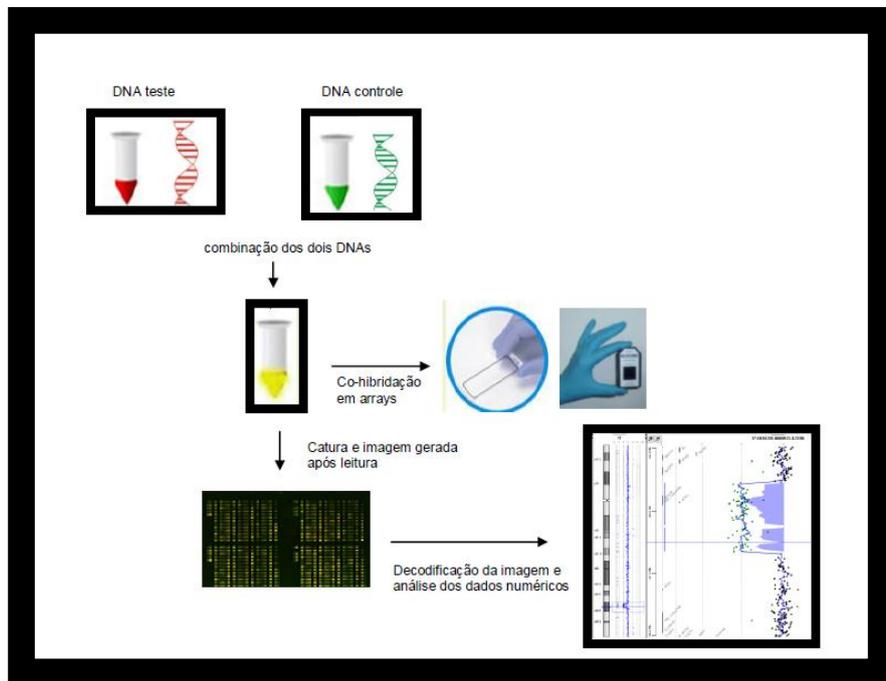
Tecnicamente, no processo de *array*-CGH o DNA genômico da amostra que se pretende estudar (DNA teste) e o da amostra controle (DNA de referência) são marcados pela incorporação de um precursor de nucleotídeo contendo um fluorocromo apropriado (ex., Cy5 dCTPs ou Cy3 dCTPs) que fluoresce quando exposto à uma luz de comprimento de onda específico. O DNA teste e quantidades iguais de DNA controle marcados, são co-hibridizados a uma matriz de DNA (*arrays*) contendo segmentos de DNA (clones) pré-selecionados correspondentes às diferentes localizações

cromossômicas. Cerca de milhares ou milhões de clones de DNA mapeados e representativos do genoma são imobilizados em placa ou lâmina (plataforma) e são usados como a fase sólida para a hibridação.

Os fragmentos clonados de DNA, que inicialmente substituíram os cromossomos metafásicos, têm localização conhecida nos cromossomos e podem ser diretamente relacionados a sequências do genoma humano. A distância entre cada alvo imobilizado pode variar de alguns milímetros a poucos micrômetros, dependendo da plataforma de *arrays* utilizada. A molécula imobilizada em uma lâmina ou placa é indicada como uma sonda, enquanto o alvo é a molécula em solução exposta ao *array*.

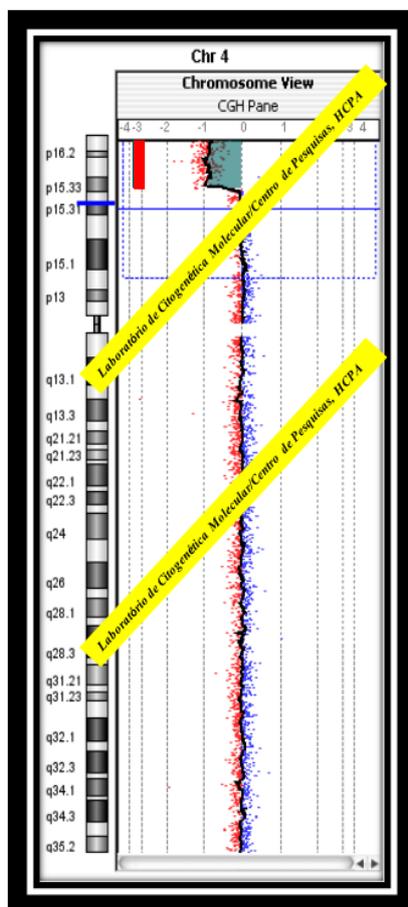
Após a co-hibridização, a fluorescência emitida por cada clone é capturada utilizando-se um *scanner* a laser. Uma imagem fluorescente é gerada e a intensidade de fluorescência emitida por Cy3 (ex., DNA controle) e Cy5 (ex., DNA teste) é comparada. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um programa de conversão de dados da intensidade de hibridização para um perfil linear. As regiões com intensidade fluorescentes equivalentes aparecem como uma mistura dos DNAs teste e de referência, que apresentam um índice normalizado correspondente a 1.0. As regiões com perda de seqüências de DNA (deletadas) apresentam um índice significativamente menor que 1.0. As regiões com ganhos de seqüência de DNA (amplificação) apresentam índice significativamente maior que 1.0 (Figura 3 e Figura 4).

Figura 3. Representação esquemática das principais etapas do método de *array* CGH.



Os DNAs da amostra teste e do controle são marcados diferencialmente com fluorocromos e posteriormente hibridizados a uma plataforma de *array* contendo segmentos de DNA imobilizados. Os passos seguintes são: captura de imagens e análise dos comprimentos de onda; decodificação da imagem (arquivo numérico); análise dos dados numéricos gerados; interpretação dos resultados (Fonte: Riegel M. Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array-CGH). In: Maluf WS e Riegel M. Citogenética Humana. 1. ed. Porto Alegre: Artmed. 2011).

Figura 4. Exemplo de perfil de microdeleção observado pelo método de *array*-CGH.



Perfil do cromossomo 4 de uma amostra com $\text{del}(4)(\text{p}16.3)$ com perda distal do número de cópias na região 4p16.3. Amostra de DNA do propósito (em vermelho) e amostra de DNA de referência (em azul) (Fonte: Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

A escolha das regiões incluídas na pesquisa de alterações cromossômicas define sua classificação basicamente em dois tipos: os *arrays* representativos do genoma inteiro e o direcionado para regiões específicas, geralmente envolvidas em rearranjos cromossômicos já descritos (*target array*). O método de *array*-CGH envolve um conjunto de técnicas moleculares aplicáveis a citogenética e que requerem conhecimentos e aptidões das duas especialidades.

A análise comparativa de genomas tem levado à descoberta de novas síndromes que foram clinicamente delineadas somente após a determinação da alteração cromossômica. O fenótipo de várias dessas síndromes de microdeleção descritas recentemente, são mais raros e possuem menos características clínicas específicas, como

atraso no desenvolvimento e diferenças comportamentais (Roos e col., 2009; Deak e col., 2011; Boudry-Labis e col., 2012; Hancarova e col., 2012; Palumbo e col., 2012; Vergult e col., 2012; Zeeman e col., 2012; Thevenon e col., 2013).

2.4 Variação no número de cópias (CNV) e doenças genômicas

O Termo CNV foi definido como um segmento de DNA que pode variar de 1kb a vários Mb e que esta presente em número variável de cópias em comparação a um genoma de referencia (Redon e col., 2006). A variação no genoma humano está presente em muitas formas, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo, polimorfismos de pequenas inserções-deleções, número variável de sequências repetitivas e alterações estruturais genômicas, que são duplicações e deleções grandes (Iafrate e col., 2004). Diferentes mecanismos, como NAHR (*Nonalelic Homologous Recombination*), NHEJ (*Nonhomologous End-Joining*), retrotransposição e FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*), podem estar associados às origens desses rearranjos genômicos e formação das CNVs, que podem ser deleções, duplicações, triplicações e inserções (rev. Stankiewicz e Lupski, 2010).

As CNVs podem ocorrer em parte das seqüências de um gene ou em um gene inteiro. Podem também estar presentes em um segmento contendo vários genes ou em elementos regulatórios. Considerando esses fatores, tem sido sugerido que várias CNVs contribuem para o desenvolvimento de doenças através da influência na alteração de funções fisiológicas. A detecção e o mapeamento de alterações do número de cópias de certas regiões do genoma oferecem uma importante contribuição para a associação entre os defeitos moleculares encontrados e o fenótipo estudado. Assim, o método de *array-CGH* tem sido largamente empregado no rastreamento ao longo do genoma de alterações cromossômicas que podem representar a evidência inicial para a identificação de um ou mais genes associados a doenças genéticas. As CNVs intragênicas ou que abrangem um único gene podem ter consequências funcionais similares às das mutações de ponto patogênicas. As CNVs maiores podem incluir múltiplos genes, levando à síndromes de genes contíguos (Lee e col., 2007; Lee e Scherer 2010).

2.5 Mecanismos de origem de rearranjos no genoma

Variações no DNA podem induzir a alteração da condição diplóide levando a deleção ou duplicação do material genômico. Esses rearranjos originam doenças genômicas quando levam a alterações na dosagem ou interferem na regulação de gene(s) haploinsuficientes. Os rearranjos patogênicos podem ser recorrentes, com tamanhos constantes e pontos de quebra que não se alteram ou podem ser não recorrentes, com tamanhos diferentes e pontos de quebra variáveis. Os pontos de quebra variáveis dos rearranjos não recorrentes, podem estar dispersos em uma mesma região ou agrupados em um dos lados, mas com uma região de sobreposição comum denominada SRO – *Smallest Region of Overlap* (Gu e col, 2008).

Determinadas regiões do genoma possuem características estruturais que as predispõe a rearranjos. Esses rearranjos resultam em desequilíbrios que originam as chamadas doenças genômicas, assim denominadas por Lupski em 1998. As doenças genômicas diferenciam-se dos mecanismos clássicos de uma doença genética, em que um fenótipo anormal é principalmente originado por mutações de ponto.

Têm sido propostos três mecanismos principais de formação de rearranjos genômicos (deleções, duplicações, triplicações e inserções): a recombinação homóloga não alélica: NAHR-*Nonallelic Homologous Recombination*; NHEJ -*Nonhomologous DNA end joining* e FoSTes-*Fork Stalling and Template Switching* (Gu e col., 2008; rev. Stankiewicz e Lupski 2010). Esses rearranjos desencadeiam quadros clínicos em função da modificação da dosagem gênica. Isso significa que existem genes cujos efeitos são sensíveis quando uma região é deletada ou duplicada. Além disso fenótipos alterados podem ocorrer em decorrência da ruptura de regiões codificadores ou de regiões regulatórias.

Alterações cromossômicas constitucionais com alta recorrência condicionam diversas síndromes e resultam de NAHR entre repetições de baixo número de cópias (LCR - *Low Copy Repeats*) que podem incluir genes/pseudogenes e diversas seqüências repetidas, em *tandem* ou invertidas. Essas alterações são geralmente deleções e duplicações, na maioria submicroscópicas. NAHR é o mecanismo que origina a maioria dos rearranjos cromossômicos estruturais recorrentes como, por exemplo a microdeleção de aproximadamente 3.7 Mb no cromossomo 17p11.2 (presente na maioria dos indivíduos com síndrome de Smith-Magenis, OMIM #182290) e a deleção

do cromossomo 7 (que resulta na síndrome de Williams-Beuren, WBS, OMIM #194050). No cromossomo 17p11.2, os segmentos de junção correspondem à fusão de LCR que cercam o segmento deletado em 17p11.2. Essas mesmas LCR estão envolvidas na microduplicação do cromossomo 17, que causa a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 1 (CMT1A, OMIM 601097) (rev. Shaw e Lupski 2004). As LCR compreendem de 5% a 10% do genoma, têm entre 10 a 500 kb de extensão e se assemelham em mais de 95%. (Stankiewicz e col., 2003). O mecanismo NAHR é o principal processo que dá origem às doenças genômicas, predominantemente, de síndromes recíprocas de deleções e duplicações cromossômicas intersticiais (Shaw e Lupski 2004; Lupski e Stankiewicz 2005)

No mecanismo NHEJ os rearranjos genômicos não recorrentes são caracterizados por regiões de micro-homologias ou alterações de poucas bases nos pontos de quebra. O mecanismo FoSTes é induzido por erros no processo de replicação e origina rearranjos genômicos não recorrentes com complexidades e micro-homologias nas junções dos pontos de quebra (Lee e col., 2007; Gu e col., 2008).

O mecanismo de NAHR está muito bem estabelecido na origem de rearranjos genômicos recorrentes. E sugere-se que os mecanismos de NHEJ e FoSTes são o processo principal responsável pelos rearranjos genômicos não recorrentes.

2.6 Microdeleções cromossômicas associadas à síndromes de microdeleção ou síndrome de genes contíguos.

Microdeleções cromossômicas são alterações do material genético que frequentemente possuem 1-3 Mb de comprimento e podem envolver vários genes contíguos. O tamanho e a localização exata de uma microdeleção associada a uma determinada síndrome pode ser variável, mas uma "região crítica" específica é constantemente envolvida. Síndromes com dismorfias graves, usualmente acompanhadas de comprometimento cognitivo, são frequentemente causadas por um desequilíbrio no material genético do indivíduo. Portanto, uma síndrome de microdeleção é a consequência clínica da deleção de um segmento submicroscópico, resultando em haploinsuficiência (presença apenas de cópia única) de um ou mais genes (Schinzel, 2000).

Como estas alterações freqüentemente envolvem deleção de uma série de genes adjacentes, também são chamadas de síndromes de deleção de genes contíguos. As doenças genômicas resultam da perda ou ganho de material cromossômico / DNA, sendo que os distúrbios genômicos mais comuns e melhor delineados são divididos em duas categorias principais: aqueles decorrentes da perda do número de cópias de seqüências de DNA (síndromes de deleção) e aqueles decorrentes de ganho do número de cópias de seqüências de DNA (síndromes de duplicação).

As síndromes de microdeleção ou de genes contíguos são incluídas em um grupo de defeitos de desenvolvimento, identificadas e reconhecidas dentro de padrões de malformações definidas (Graham 2007). Os quadros clínicos associados a essas síndromes são relativamente específicos e as características fenotípicas foram freqüentemente reconhecidas antes que a microdeleção ou microduplicação cromossômica responsável pela condição clínica fosse identificada. Essas síndromes são geralmente reconhecidas a partir do exame físico e radiológico e as características mais freqüentes são a deficiência intelectual e o retardo de crescimento. Um dos grandes desafios da genética é a identificação e o diagnóstico clínico resultante de uma microdeleção ou duplicação cromossômica. Esses distúrbios são caracterizados por manifestações clínicas no adulto que em algumas situações são menos identificáveis nos lactentes e crianças. Algumas das microdeleções recorrentes e não recorrentes avaliadas nesse estudo serão revisadas a seguir.

2.6.1 Microdeleções cromossômicas recorrentes

Deleção 5q35 – Síndrome de Sotos (SoS, OMIM #606681)

A SoS também conhecida como gigantismo cerebral, na maioria dos casos é causada pela haploinsuficiência do gene *NSD1*, localizado na região 5q35 (Kurotaki e col., 2002). Entre outras funções, acredita-se que o gene *NSD1* regule a atividade de outros genes envolvidos no desenvolvimento e crescimento. Estudos populacionais mostram que deleções envolvendo o gene *NSD1* são a causa mais freqüente de SoS na população japonesa (Kurotaki e col., 2005), enquanto que as mutações de ponto no gene *NSD1* são as mais comuns na população caucasiana (Kamimura e col., 2003; Nagai e col., 2003).

A SoS é clinicamente caracterizada pelo crescimento acelerado pré e pós-natal e idade óssea avançada nos 4 a 5 primeiros anos de vida. Outras anomalias encontradas são a deficiência intelectual ou dificuldade de aprendizagem, macrocefalia, fâcies típica com fronte proeminente, hipertelorismo, estrabismo, fissura palpebral antimongolóide, orelhas grandes, palato alto e estreito, mão e pés grandes e possibilidade de erupção prematura dos dentes (Faravelli e col., 2005; *Genetics Home Reference*, 2012; *Gene Reviews*, 2012).

Apesar da sobreposição clínica de SoS com outras síndromes, alguns autores sugerem que as alterações no gene *NSDI* são específicas para a SoS e, por isso, o diagnóstico genético para qualquer caso em que haja alteração do gene *NSDI*, é o da síndrome de Sotos (Tatton-Brown e col 2005; Tatton-Brown e Rahman, 2007).

Deleção 7q11.23 – Síndrome de Williams-Beuren (WBS, OMIM #194050)

A WBS é considerada uma síndrome de genes contíguos que apresenta um padrão de herança autossômica dominante, com uma prevalência estimada de 1 para cada 7.500 nascidos vivos (Stromme e col, 2002). Caracteriza-se por apresentar fâcies dismórfica típica, cardiopatia congênita, baixa estatura, anomalia geniturinária, deficiência intelectual e, ocasionalmente, hipercalcemia (Jones e col, 1975; Pagon e col., 1987; Cortada e col., 1980). Aproximadamente 90% a 95% dos afetados apresentam uma deleção submicroscópica de aproximadamente 1.5 a 1.8 Mb no *locus* do gene da elastina (*ELN*) (Morris 2010), na região 7q11.23 (Figura 5). As características clínicas, comportamentais e de personalidade dos pacientes com WBS são, pelo menos em parte, decorrentes da deficiência dos genes (aproximadamente 28-30 genes) contidos na região 7q11.23. O gene *ELN* consiste de 34 exons e ocupa 47kb do DNA genômico. Ele codifica a proteína elastina que é encontrada no tecido arterial em camadas paralelas separadas por camadas de músculo liso. A haploinsuficiência do gene da elastina é responsável pela maioria dos problemas cardiovasculares encontrados com frequência nos afetados pela síndrome de Williams O desvio de comportamento observado nos portadores de *WBS* inclui ansiedade e deficit de atenção (Morris e col., 1988; Francke 1999; Marler e col., 2010; Morris e col., 1990; Morris e col., 1998; Morris e col., 1998; Morris 2010; Sakurai e col., 2011; Barozzi e col., 2012).

O segundo gene frequentemente deletado nos pacientes com *WBS* é o gene LIM-Kinase 1 que se expressa principalmente no sistema nervoso central. Tem sido proposto que este gene é o responsável pelo perfil cognitivo distinto da *WBS* caracterizado pela deficiência de integração visio-motora (Eckert e col., 2006; Tassabehji e col., 1999). A haploinsuficiência do gene *GTF2I* tem sido associado com o aumento da capacidade de interação social observada na *WBS* (Antonell e col., 2010; Sakurai e col., 2011).

Vários estudos envolvendo a região da microdeleção dos indivíduos afetados pela *WBS* visam determinar a função de cada um dos genes localizados nesse intervalo cromossômico e a relação deles com o quadro clínico da *WBS* (De Luis, 2000; Morris & Mervis, 2000; Cairo e col 2001; Mervis e Becerra, 2007; Schubert C 2009; Zhang e col. 2009; Antonell e col. 2010; Sakurai e col 2011). Embora vários estudos ainda sejam necessários para a determinação dos genes envolvidos na *WBS*, a análise de deleções atípicas evidenciam os genes candidatos *LIMK1*, *CYLN2*, and *GTF2I* como responsáveis pelo fenótipo neurológico e de desenvolvimento na *WBS* (Van Hagen e col 2007; Scott e Olson 2007; Smith e col, 2009; Schubert 2009; Antonell e col., 2010; Matsumoto 2011; Barozzi col., 2012; Widagdo e col, 2012; Palmer e col 2012).

Deleção 8q24.11 – Síndrome de Langer-Giedion (LGS;TRPS -II, MIM #105230)

Prof. Giedion (1925-2013) em 1966, foi o primeiro a estabelecer a correlação entre as principais alterações clínicas e radiológicas presentes nessa síndrome, reconhecer o caráter genético da mesma e propor a denominação que persiste até o presente, referida como "*trichorhinophalangeal syndrome*". Atualmente, essa síndrome apresenta três tipos: síndrome tricorriofalangeana tipo I (*TRPS* tipo I) caracterizada clinicamente por cabelos esparsos e de crescimento lento, nariz em formato de pera, filtro alongado, lábio superior fino e alterações ósseas (Glöckner e col., 2000; Momeni e col., 2000; Snyder e col., 2012) ; síndrome tricorriofalangeana tipo II (*TRPS* tipo II) ou síndrome de Langer-Giedion, na qual, às manifestações possíveis do tipo I, se associam a microcefalia e a deficiência intelectual, exostoses cartilaginosas múltiplas em costelas e vértebras, e outras manifestações osteoarticulares mais graves e; a síndrome tricorriofalangeana tipo III (*TRPS* tipo III) ou síndrome Sugio-Kajii, que é a variante mais severa do tipo I, associada com uma baixa estatura (Hall e col., 1974; Wilson e col., 1979; Bowen e col., 1985; Parrish e col., 1991; Carvalho e col., 2011).

A TRPS tipo I é causada por mutações no gene *TRPS1* localizada na região 8q24.11 e a haploinsuficiência do gene esta diretamente relacionada a maioria das características clinicas dessa condição. A TRPS tipo II é causada por uma microdeleção no braço longo do cromossomo 8 (8q24.11) envolvendo o gene *EXT1* (OMIM #133700). O gene *EXT1* codifica a proteína exostosina-1, associada à regulação de fatores de crescimento e a perda da função desse gene leva a exostose na TRPS tipo II (Lüdecke e col., 1995).

Deleção 15q11-q13 – Síndrome de Angelman (AS, OMIM #105830)

Deleção 15q11-q13 – Síndrome de Prader-Willi (PWS, OMIM #176270)

Uma microdeleção intersticial entre as regiões 15q11 e 15q13 pode resultar em síndromes completamente distintas dependendo da origem parental dos alelos. Uma deleção no cromossomo 15 de origem paterna resulta em PWS, enquanto que uma deleção similar no cromossomo 15 de origem materna resulta em AS.

A PWS é uma doença neurocomportamental e uma das mais freqüentes síndromes dismórficas relacionadas a uma microdeleção cromossômica. A incidência da PWS é de aproximadamente 1/10.000 - 1/30.000 nascimentos e é geralmente esporádica, tendo sido relatados poucos casos familiares. O recém-nascido (RN) apresenta hipotonia e dificuldade de sucção. O RN de sexo masculino podem apresentar criptorquidia e o RN de sexo feminino hipoplasia dos pequenos lábios. Além da hipotonia, apresentam atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e de desenvolvimento. O apetite excessivo se inicia entre 1 e 6 anos de idade e a partir desse momento a criança pode apresentar obesidade. A PWS tem sido a condição mais comum de obesidade associada com causa genética (Cassidy 1984; Cassidy 1997; Cassidy e Driscoll 2009; Cassidy 2012). O adolescente tem obesidade, baixa estatura, hipogonadismo, mãos e pés pequenos, problemas de aprendizado e de comportamento (Figura 5).

A AS é um distúrbio neurológico que causa deficiência intelectual severa, microcefalia pós-natal, alterações do comportamento e algumas características físicas próprias (Williams e col., 1995; Williams 2006, *GeneReviews* 2012). Uma característica marcante dos afetados é a aparência facial alegre, com acessos de riso não motivados. A prevalência estimada da AS é de 1/10.000-1/15.000 nascimentos. A causa genética da PWS e da AS é a ausência de expressão de alelos localizados na região 15q11-q13. A região 15q11-q13 é caracterizada pela presença de genes cujo padrão de expressão é dependente de sua origem ser materna ou paterna. A ativação diferencial de genes dependendo do genitor do qual eles são herdados é conhecida como *imprinting* genômico (Nicholls et al., 1989; Nicholls e col., 1996). As síndromes de Prader-Willi e de Angelman foram as primeiras doenças humanas reconhecidas como determinadas pelo mecanismo de *imprinting* genômico.

A PWS é causada pela ausência de genes paternos que, normalmente, estão ativos no segmento cromossômico 15q11q13. Esses genes paternos podem estar ausentes como resultado de diferentes mecanismos: ~70% dos casos de PWS apresentam deleção paterna do segmento 15q11-q13 (Figura 5); 28% apresentam dissomia uniparental materna (mUPD), evento em que ambos cromossomos 15 são de origem materna e não há herança de cromossomo paterno; e, cerca de 5% dos indivíduos afetados apresentam uma microdeleção no centro controlador do *imprinting*, denominado centro de *imprinting* (IC), localizado no segmento 15q11q13 (Nicholls e col., 1996; Robinson e col., 1996a, Robinson e col., 1996b; Glenn e col., 1997; Robinson e col., 1998; Robinson e col., 2000; Saitoh e col., 1997; Cassidy e col., 2012; Yoon Cho S e col., 2013; Izumi e col., 2013).

A causa genética da AS é a ausência de expressão de alelos maternos localizados na região 15q11-q13. Cerca de 70% dos afetados têm uma deleção de aproximadamente 4 Mb, de origem materna, do segmento 15q11-q13 (Saitoh e col., 1997; Sahoo e col., 2006). Cerca de 2 a 3% dos casos têm como causa a dissomia uniparental paterna (patUPD) do cromossomo 15, em que ambas as cópias do cromossomo 15 são de origem paterna e não há herança do cromossomo materno (Malcolm e col., 1991). A AS pode ainda ser causada por defeito no centro de *imprinting*, que causa a metilação do alelo materno e modelo de expressão gênica do cromossomo paterno (Buiting e col., 1999; Buiting e col. 2003) e em alguns casos por mutações de ponto que anulam a função do gene (Monaghan e col., 2006). Acredita-se que a perda ou mutações no gene *UBE3A*

(gene E3A da ubiquitina ligase) são a principal causa do quadro clínico central da AS (Kishino e col., 1997; Matsuura e col., 1997; Sartori, 2008; Camprubí et al., 2009).

Existe um número de pontos de quebra (regiões cromossômicas suscetíveis a quebras) na região 15q11-q13 em AS conhecidos como *BP1*, *BP2* e *BP3*. As deleções nessa região são subclassificadas em classe I (*B1* a *B3*) e II (*B2* a *B3*) dependendo do ponto de quebra (Sahoo e col., 2006; Doornbos e col., 2009; Murthy e col., 2010; Burnside 2011; Perez e col., 2011). Indivíduos com deleção classe I tem tendência a desenvolver um quadro clínico mais grave quando comparados com indivíduos com deleção classe II (Peters e col., 2004).

A investigação da região 15q11,2-q13 utilizando o método de FISH detecta apenas os casos em que uma deleção, translocação ou alteração estrutural envolvendo o cromossomo 15 ocorre. Sugere-se que o diagnóstico laboratorial mais eficiente para a PWS e AS é por meio de um teste molecular, que determina o padrão de metilação dentro da região PWS/AS, utilizando-se hibridização com sondas sensíveis à metilação dos *loci* SNRPN e PW71 (Zeschnigk e col., 1997; Bittel e col., 2007; White e col., 2007).

Deleção 17p11.2- síndrome de Smith Magenis (SMS, #OMIM 182290)

A SMS é uma condição caracterizada por múltiplas anomalias congênitas (Osório e col., 2012) e alterações comportamentais, associadas à deleção da região cromossômica 17p11.2 ou à mutações do ponto gene *RAI1* (retinoic acid-induced 1) (Smith e col., 1982; Coley e col., 1990; Smith e col., 1998; Vlangos e col. 2005; Gropman e col., 2006; Taylor e col., 2008; Edelman e col., 2008; Elsea 2008; Boudrean e col., 2009; Vlangos e col., 2005; Williams e col., 2010; Vieira e col., 2012; *GeneReviews* 2012).

A incidência da SMS é estimada em 1:15.000-1:25.000 nascimentos. O quadro clínico da SMS se sobrepõe ao de outras síndromes de deficiência intelectual como a PWS, a WBS e a síndrome de Down, o que pode dificultar o diagnóstico clínico. Da mesma maneira que em outras síndromes de microdeleção, existe grande variabilidade no fenótipo da SMS, principalmente nas malformações associadas (Potocki e col., 2003; Williams e col., 2010; Vieira e col., 2012). Além disso, ocorre uma modificação nas dismorfias faciais, que são muito sutis nos primeiros anos de vida, e tornam-se mais

evidentes no final da infância e na adolescência (Allanson e col., 1999), bem como uma mudança evolutiva dos aspectos neurológico e comportamental (Smith e col., 1998; Boudreau e col., 2009).

A deleção clássica em 17p11.2 é de 3.5 Mb e está presente em 70% dos afetados. Deleções atípicas ocorrem em 20% dos casos e mutações do gene *RAI1* tem sido observada em 10% dos casos de SMS. Pouco se sabe sobre a função do gene *RAI1*, porém sugere-se que *RAI1* é uma proteína nuclear que possui atividade de fator de transcrição no núcleo. Entretanto, devem haver outras funções de *RAI1* relacionadas ao fenótipo clínico da SMS. Nos casos de mutação não foi observado a expressão da proteína nuclear (Carmona-Mora e col., 2012).

Deleção 22q11.2 – síndrome de deleção 22q11.2 (22qDS, OMIM # 188400/ # 192430)

A deleção do cromossomo 22q11.2 está associada com a síndrome de DiGeorge (DGS) e síndrome Velocardiofacial (VCFS). Os aspectos clínicos foram primeiramente descritos já no ano de 1829, e a ausência congênita do timo e de glândulas paratireóides foi descrita pelo Dr. Angelo DiGeorge em 1965 (Lischner e col., 1967) . Na década de 80, foi descrita a associação da deleção 22q11.2 na maioria dos indivíduos, bem como em indivíduos com síndromes similares como a VCFS, também conhecida como síndrome de Shprintzen (Shprintzen e col., 1978; Lim e col., 1978; De la Chapelle e col., 1981; Shprintzen e col., 2005). Aproximadamente 80-90% dos indivíduos com DGS tem uma microdeleção envolvendo a região 22q1 (loci DGSI), enquanto cerca de 2% a 5% têm uma deleção no cromossomo 10p13-14 (loci DGSII) (Dawn e col., 1996; Lichtner e col 2008).

A DGS apresenta uma constelação de sinais e sintomas e se associa frequentemente à presença de fenda palatina, à sequência de Pierre-Robin (Robin e Shprintzen 2005) e aos defeitos cardíacos congênitos, especialmente do tipo conotruncal (Rosa e col., 2008; Lammer 2009; Kuehl e col., 2010). A maioria dos pacientes com suspeita de 22qDS encaminhados para um diagnóstico laboratorial apresentam um defeito cardíaco, hipocalcemia e imunodeficiência no período neonatal. A VCFS possui algumas características que se sobrepõem a DGS, tais como defeitos cardíacos conotruncais e dismorfias da face, sendo também causada por del22q11.

A 22qDS apresenta uma importante relação com defeitos do tipo conotruncal. A frequência relatada em investigações de 22qDS relacionadas com defeitos conotrunciais varia de 4% a 15% (Lammer e col., 2009), mas alguns estudos apontam índices entre 17% e 48% (Derbent e col., 2003; Goldmuntz e col., 1993; Iserin e col., 1998; Webber e col., 1996; Goldmuntz e col., 1998; Worthington e col., 1998; Momma 2010). Estas diferenças parecem estar relacionadas, especialmente, com a faixa etária dos pacientes, sua origem/procedência, e a frequência de certos defeitos cardíacos, como a interrupção do arco aórtico que, dentre as malformações conotrunciais, associa-se mais à 22qDS.

Com o objetivo de determinar a prevalência, o fenótipo e a incidência de doenças cardíacas, foram realizados estudos abrangentes que revelaram que as deleções no cromossomo 22q11.2 são relativamente comuns na população em geral, evidenciando que a 22qDS é síndrome de microdeleção de maior prevalência (Botto e col., 2003; Agergaard e col 2012) e que existem subtipos de fenótipos relacionados a del22q11.2 (Sinderberry e col., 2013). A região 22q11.2 é cercada por regiões de repetição de baixo número de cópias (*Low Copy repeats, LCRs*), que predispõe a região q11.2 à deleção (Shaikh e col., 2000; Saitta e col., 2004). A deleção clássica em 22q11 tem 2.5 Mb a 3 Mb e inclui cerca de 30 genes (24 genes dentro de uma região de 1.5 Mb), entre os quais *UFDIL (Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like)*, o *TBX1 (T-BOX 1)* e o *TUPLE1 (TUP-Like Enhancer of split gene-1 ou HIRA)*, expressos nas células derivadas da crista neural e possíveis responsáveis pelos achados clínicos observados na 22q11DS. O gene *TBX1* localiza-se entre a *LCR22-1* and *LCR22-3* e sugere-se que seja crítico para a manifestação do quadro clínico da 22qDS (Xu e col 2011).

2.6.2 Microdeleções cromossômicas não recorrentes de tamanho variável

Deleção 4p16.3 – síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS-MIM #194190).

Descrita independentemente em 1965 por Wolff e col. e por Hirschhorn e col., a WHS caracteriza-se por um grave retardo psicomotor e de crescimento. O peso ao nascimento é geralmente inferior a 2.000 g, apesar de um período gestacional normal ou mesmo prolongado, indicando um retardo de crescimento intra-uterino. Os indivíduos afetados têm uma face característica, associado a um elmo grego, apresentando microcefalia, hipertelorismo, nariz grande e adunco, pavilhões auriculares grandes, simples, por vezes de implantação baixa, micrognatia, lábio leporino e/ou palato fendido. São também muito frequentes os seguintes achados orofaciais: glabella proeminente, fissuras palpebrais antimongolóides, estrabismo, coloboma da íris, boca de carpa (curvatura da boca voltada para baixo), fossetas ou apêndices pré-auriculares, hemangiomas e, em alguns poucos casos, defeitos de couro cabeludo em linha média (Dallapiccola e col., 1993; Estabrooks e col., 1995; Battaglia e col., 2008; Hanley-Lopez e col., 1998; Hirschhorn, 2008; Zollino e col., 2008; Misceo e col., 2012; Coppola e col., 2013).

Duas regiões críticas foram descritas associadas à patogênese da WHS: região crítica 1 (*WHSCR1*) consiste em um intervalo de 165kb definido pelos loci *D4S166* e *D4S3327*, e inclui o gene candidato 2 (*WHSC2*) (OMIM 606026) e parte do gene candidato 1 (*WHSC1*) (OMIM 602952). A região crítica 2 (*WHSCR2*) consiste em um intervalo de 300-600kb definido pelos loci *D4S3327* e *D4S98-168* e inclui o gene *LETM1* (OMIM 604407), o qual origina uma proteína envolvida na homeostasia do cálcio cuja deleção resulta em convulsões, e uma parte de *WHSC1*, o qual origina uma enzima de remodelação da cromatina cuja deleção estaria envolvida no desenvolvimento da fâcies característica da WHS (Wright e col., 1997; Zollino e col., 2003) (Figura 5).

Em geral, ambas as regiões 1 e 2 sobrepõem-se, sendo que todos os pacientes com SWH são portadores de deleções no gene *WHSC* (Engbers e col., 2009). Entretanto, apenas a deleção do gene *WHSC1* não justifica todas as características e variáveis fenotípicas relatadas nos indivíduos portadores. Provavelmente, fatores genéticos adicionais, como a influência de seqüências flanqueadoras à *WHSCR*,

levariam a uma modificação da expressão do gene em alguns casos explicando a variabilidade fenotípica dos indivíduos afetados (Nimura e col., 2009; Hannes e col., 2012).

Aparentemente, deleções terminais *de novo* envolvendo a região crítica são a causa mais frequente da WHS, ocorrendo em 55-75% dos portadores (Shannon e col., 2001; South e col., 2008; Zollino e col., 2008). O relato de deleções intersticiais é menos frequente e o tamanho das deleções envolvendo a região crítica pode variar de 3.5 Mb a 25Mb (Rauch e col., 2001; Buggenhout e col., 2004; Bansinko e col., 2008; Zollino e col., 2008; Izumi e col., 2010; Riegel M. obs. pessoal, 2012). No restante dos casos originam-se de translocações não equilibradas (a maioria envolvendo o cromossomo de origem materna), sendo que em 5% dos casos, a causa permanece desconhecida. Evidencia-se que em indivíduos portadores dessa condição, as translocações entre os cromossomos 4 e 8 ocorrem mais frequentemente que o esperado. Além do gene *WHSC1*, outros genes candidatos têm sido relacionados à WHS. A maior ou menor expressão de um determinado gene pode resultar em características clínicas semelhantes. Um exemplo disto é o gene *LETMI*, no qual tanto a haploinsuficiência quanto a superexpressão estão associadas a crises convulsivas. (Cyr e col., 2011; Hammond e col., 2012).

Deleção 5p15.2 – síndrome de Cri-du-Chat (CdCS, OMIM #123450)

Deleções no braço do cromossomo 5 estão associadas a Síndrome de Cri-du-Chat, uma síndrome rara, com uma incidência estimada entre 1:15.000 e 1:50.000 nascimentos. Mesmo assim, é provavelmente a deleção de cromossomo autossômico mais freqüente em humanos (Schinzel, 2000). Essa condição é caracterizada por deficiência intelectual grave e retardo de crescimento, choro característico (“miado de gato”) e dismorfismo facial típico, que inclui hipertelorismo, epicanto, retrognatismo e micrognatismo. Outras características clínicas encontradas são peso baixo ao nascer, hipotonia, face arredondada, olhos amendoados e microcefalia (Lejeune et al,1963; Niebuhr,1971; Schinzel 2000).

Esta alteração cromossômica pode ocorrer como consequência de deleção terminal (78%), intersticial (9%) ou é produto de uma translocação em desequilíbrio (5%) de um segmento de 5p sendo que a região crítica responsável pelo fenótipo da

CdCS se localiza entre 5p15.2-5p15.3 (Simmons e col., 1998; Cerruti, 2006; Barber e col, 2011; Sheth F e col 2012).

Zhang e col 2005 analisaram 94 indivíduos por *array*-CGH e definiram 3 regiões em 5p associadas à dificuldade cognitiva , duas (IDI e III) sobrepõem-se a região crítica de CdCS e contém os genes *Semaphorin 5A* em 5p13.1 (*SEMA5A*) e *dcatenin* (*CTNND2*) em 5p15.2 (Cerruti Mainardi, 2006; Yuan e col 2013). A terceira região, IDIII, é proximal a região crítica da CdCS e se estende da região 15p15.1 a porção distal 5p13.3. Na grande maioria dos casos, a del5p (5-40 Mb) pode ser detectada com métodos de citogenética clássica. Entretanto, devido à variabilidade do fenótipo nos casos familiares, essa deleção pode apresentar deleções atípicas, dificultando a sua identificação (comunicação pessoal: Mariluce Riegel, 2013).

Deleção 16p13.3 – síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS, OMIM #180849)

A RTS é bastante rara, com uma incidência estimada em 1:125.000 a 1:330.000 nativos. Na Holanda há relato de um maior número de casos com uma incidência estimada de 1:100.000 a 1:125.000 (Hennekam e col., 1990). Trata-se de uma síndrome caracterizada principalmente por dismorfismos craniofaciais, polegares e háluces alargados, múltiplas malformações, baixa estatura e deficiência intelectual (Rubinstein e Taybi 1963; Hennekam e col., 1989; Stevens e col. 1990; Cantani e col., 1998; Wiley e col. 2003; Hennekam e col., 2006; Cantani e col., 1998; Wiley e col. 2003; Kumar e col., 2012).

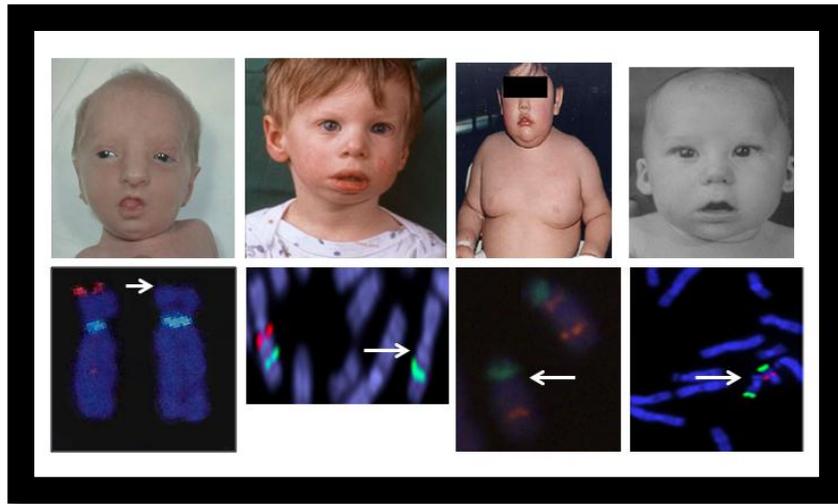
Petrij e col. 1995 demonstraram que os pontos de quebra cromossômica em indivíduos com a RTS ocorrem na região 16p13.3 que inclui o gene *CBP*. Mutações em *CBP* têm sido detectadas em 40% dos indivíduos afetados. Mutações em outro gene, *EP300*, foram detectadas em um pequeno número de casos (Roelfsema e col., 2005; Tsai e col., 2011). É provável que outros genes desconhecidos sejam responsáveis pela RTS, considerando que cerca de 50% dos portadores de RTS não possuem deleção ou mutação nos genes *CBP* ou *EP300*.

Deleção 17p13.3 – síndrome de Miller-Dieker (MDS, OMIM #247200/ Lisencefalia (LIS-1, MIM #607432)

A MDS é uma síndrome de genes contíguos que é caracterizada por lisencefalia (“cérebro liso”), uma malformação cerebral que resulta de um distúrbio na migração neuronal entre o período de 9 a 13 semanas de gestação. O quadro clínico da síndrome de Miller-Dieker é caracterizado por microcefalia, têmporas estreitas, nariz pequeno e arrebitado, fissura palatina, enrugamento da testa ao chorar, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual e convulsões (Jones e col., 1980; Stratton e col., 1984; Dobyns e col., 1983; Greenberg e col., 1986; Van Tuinen 1988).

Mutações ou deleções no gene *LIS1* (= *PAFAH1B1*) localizado na região 17p13.3 são responsáveis pela lisencefalia. Alguns indivíduos apresentam deleções menores que causam uma lisencefalia isolada (LIS type 1 ou Lisencefalia clássica) (Pilz e col., 1998; De Rijk-van Andel, 1991). Outros casos possuem deleções que incluem o gene *YWHAE* também localizado em 17p13.3, mas não incluem o gene *PAFAH1B1*. Nesses indivíduos ocorrem anormalidades estruturais no cérebro, mas não se observa lisencefalia (Nagamani e col., 2009; Schiff e col., 2010; Enomoto e col., 2012).

Figura 5. Exemplos de aspecto clínico e FISH de indivíduos com síndrome de microdeleção cromossômica.



Da esquerda para a direita, acima: síndrome de Wolf-Hirschhorn, $\text{del}(4)(p16.3)$; Williams-Beuren, $\text{del}(7)(q11.23)$; Prader-Willi, $\text{del}(15)(q11.2-q13)$ e DiGeorge, $\text{del}(22)(q11.2)$. Da esquerda para a direita, na parte de baixo: FISH com sonda(s) locus específica(s), *WHSCR*;4p16.3, *ELN/LIMK1/D7S613*;7q11.23, *SNRPN*;15q11-13, *TUPLE1*/22q11.2, respectivamente. A seta indica ausência da região crítica (sinal vermelho) em um dos cromossomos homólogos indicando microdeleção cromossômica (Fonte: imagens reproduzidas com permissão, Prof. Schinzel A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. 2.ed. Berlin: Walter de Gruyter, 2000 e Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar uma amostra de pacientes de alto risco com vistas à identificação e caracterização de microdeleções cromossômicas pelos métodos de FISH e de *array*-CGH em um hospital público de referência.

3.2 Objetivos secundários

1. Detectar rearranjos cromossômicos que envolvam regiões críticas associadas à síndromes de microdeleção.
2. Identificar o tipo e a frequência das microdeleções cromossômicas investigadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
3. Realizar um levantamento das síndromes de microdeleção mais frequentes encaminhadas para investigação citogenética molecular.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agergaard P, Olesen C, Ostergaard JR, Christiansen M, Sørensen KM. The prevalence of chromosome 22q11.2 deletions in 2,478 children with cardiovascular malformations. A population-based study. *Am J Med Genet A*. Mar;158A(3):498-50,2012.

Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet*.15;12, 2003.

Allanson, J.E.; Greenberg, F.; Smith, A.C. The face of Smith-Magenis syndrome: a subjective and objective study. *J Med Genet*. 36(5):394-397, 1999.

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

Antonius T, Draaisma J, Levtchenko E, Knoers N, Renier W, van Ravenswaaij C. Growth charts for Wolf-Hirschhorn syndrome (0-4 years of age). *Eur J Pediatr*.167(7):807-10, 2008.

Arnold J. Beobachtungen über Kernteilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Arch Pathol Anat*. 78:279, 1979.

Barber JC, Huang S, Bateman MS, Collins AL. Transmitted deletions of medial 5p and learning difficulties; does the cadherin cluster only become penetrant when flanking genes are deleted? *Am J Med Genet A*. 155A(11):2807-15, 2011.

Barozzi S, Soi D, Comiotto E, et al. Audiological findings in Williams syndrome: a study of 69 patients. *Am J Med Genet A*. 158A:759, 2012.

Basinko A, Douet-Guilbert N, Parent P, Blondin G, Mingam M, Monot F, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M. Familial interstitial deletion of the short arm of chromosome 4 (p15.33-p16.3) characterized by molecular cytogenetic analysis. *Am J Med Genet A*. 146(7):899-903, 2008.

Battaglia A, Carey JC. Wolf-Hirschhorn syndrome and the 4p-related syndromes. *Am J Med Genet C. Semin Med Genet*.148C(4):241-3, 2008.

Battaglia A, South S, Carey JC. Clinical utility gene card for: Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test*. 11:467-75, 2007.

Botto LD, May K, Fernhoff PM, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics* 112:101. 2003.

Boudreau EA, Johnson KP, Jackman AR, Blancato J, Huizing M, Bendavid C, et al. Review of disrupted sleep patterns in Smith-Magenis syndrome and normal melatonin secretion in a patient with an atypical interstitial 17p11.2 deletion. *Am J Med Genet A*. 149A(7):1382-91, 2009.

Boudry-Labis E, Demeer B, Le Caignec C, Isidor B, Mathieu-Dramard M, Plessis G, George AM, Taylor J, Aftimos S, Wiemer-Kruel A, Kohlhase J, Annerén G, Firth H, Simonic I,

Vermeesch J, Thuresson AC, Copin H, Love DR, Andrieux J. novel microdeletion syndrome at 9q21.13 characterised by mental retardation, speech delay, epilepsy and characteristic facial features. *Eur J Med Genet*. doi:pii: S1769-7212(12)00336-9. 10.1016/j.ejmg; 2012.

Bowen P, Biederman B, Hoo JJ. The critical segment for the Langer-Giedion syndrome: 8q24.11-q24.12. *Ann Gene*; 28:224, 1985.

Buggenhout, G.V.; Melotte, C.; Dutta, B.; Frayen, G.; Hummelen, P.V.; Marynen, P.; Matthjis, G.; Ravel, T.; Devriendt, K.; Fryns, J.P.; Vermeesch, J.R. Mild Wolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet*. 41: 691 – 698, 2004.

Buiting K, Gross S, Lich C, et al. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet*. 72:571, 2003.

Buiting K, Lich C, Cottrell S, et al. A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet*. 105:665, 1999.

Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet*.130(4):517-28, 2011.

Camprubí C, Guitart M, Gabau E, Coll MD, Villatoro S, Oltra S, Roselló M, Ferrer I, Monfort S, Orellana C, Martínez F. Novel UBE3A mutations causing Angelman syndrome: Different parental origin for single nucleotide changes and multiple nucleotide deletions or insertions. *Am J Med Genet A*. 149A:343-8, 2009.

Cantani A, Gagliosi D. Rubinstein-Taybi syndrome. Review of 732 cases and analysis of the typical traits. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2(2):81-7, 1998.

Carmona-Mora P, Canales CP, Cao L, Perez IC, Srivastava AK, Young JI, Walz K. RAI1 transcription factor activity is impaired in mutants associated with Smith-Magenis Syndrome. *PLoS One*. 7(9):e45155. doi: 10.1371/journal.pone.0045155. Epub 2012 Sep 18. 2012.

Carvalho DR, Santos SC, Oliveira MD, Speck-Martins CE. Tibial hemimelia in Langer-Giedion syndrome with 8q23.1-q24.12 interstitial deletion. *Am J Med Genet A*.155A:2784, 2011.

Cassidy SB & Driscoll DJ. Prader-Willi. *Eur J Hum Genet*. 17:3-13, 2009.

Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med*. 14(1):10-26, 2012.

Cassidy SB. Prader-Willi syndrome. *J Med Genet*. 34: 917-23, 1997.

Cerruti Mainardi P. Cri du Chat syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 1:33, 2006.

Colley AF, Leversha MA, Voullaire LE, Rogers JG. Five cases demonstrating the distinctive behavioural features of chromosome deletion 17(p11.2 p11.2) (Smith-Magenis syndrome). *J Paediatr Child Health*. 26:17,1990.

Coppola A, Chinthapalli K, Hammond P, Sander JW, Sisodiya SM. Pediatric diagnosis not made until adulthood: a case of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Gene*. 512(2):532-5, 2013.

Cortada X, Taysi K, Hartman AF. Familial Williams syndrome. *Clin Genet*. 18:173-6, 1980.

Cyr, A. B.; Nimmakayalu, M.; Longmuir, S. Q.; Patil, S. R.; Keppler-Noreuil, k. M.; Shchelochkov, O. A. A Novel 4p16.3 Microduplication Distal to WHSC1 and WHSC2 Characterized by Oligonucleotide Array With New Phenotypic Features. *Am J Med Genet Part A*, 155: 2224–2228, 2011.

Dallapiccola B, Mandich P, Bellone E, et al. Parental origin of chromosome 4p deletion in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet*. 47:921-4,1993.

Daw SC, Taylor C, Kraman M, et al. A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nat Genet*.13:458,1996.

De la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet*. 57:253, 1981.

De Luis O, Valero MC, Jurado L WBSCR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet*. 8:215-22, 2000.

De Rijk-van Andel JF, Catsman-Berrevoets CE, Halley DJ, et al. Isolated lissencephaly sequence associated with a microdeletion at chromosome 17p13. *Hum Genet*. 87:509, 1991.

Deak KL, Horn SR, Rehder CW. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med*. 31(4):543-64, 2011.

Dobyns WB, Stratton RF, Parke JT, et al. Miller-Dieker syndrome: lissencephaly and monosomy 17p. *J Pediatr*.102:552,1983.

Doornbos M, Sikkema-Raddatz B, Ruijvenkamp CA, et al. Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *Eur J Med Genet*.52:108, 2009.

Eckert MA, Galaburda AM, Mills DL, Bellugi U, Korenberg JR, Reiss AL. The neurobiology of Williams syndrome: cascading influences of visual system impairment? *Cell Mol Life Sci*. 63:1867-75, 2006.

Edelman EA, Girirajan S, Finucane, B, Patel PI, Lupsky JR, Smith ACM, et al. Gender, genotype, and phenotype differences in Smith-Magenis syndrome: a meta-analysis of 105 cases. *Clin Genet*. 71(6): 540-50, 2007.

Elsea SH, Girirajan S. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet*.16(4):412-21, 2008.

Engbers, H.; Smagt, J. J.; Slot, R.; Vermeesch, J. R.; Hochstenbach, R.; Poot M. Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR 2 regions. *Eur J Hum Genet*. 17:129:132, 2009.

Enomoto K, Kishitani Y, Tominaga M, Ishikawa A, Furuya N, Aida N, Masuno M, Yamada K, Kurosawa K. Expression analysis of a 17p terminal deletion, including YWHAE, but not

- PAFAH1B1, associated with normal brain structure on MRI in a young girl. *Am J Med Genet A*. 158A(9):2347-52, 2012.
- Estabrooks LL, Rao KW, Driscoll DA, et al. Preliminary phenotypic map of chromosome 4p16 based on 4p deletions. *Am J Med Genet*.57:581,1995.
- Faravelli F. NSD1 mutations in Sotos syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 137C:24, 2005.
- Fernandes MS, Ashton-Prolla P, Matte U, Meurer L, Osvaldt A, Bittelbrunn AC, Schlatter R, Kucyk R, da Silva FMP, Clausell N, Goldim R. A Normativa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o Armazenamento e Utilização de Materiais Biológicos Humanos e Informações Associadas em Pesquisa: Uma Proposta Interdisciplinar. *Rev. HCPA* 30(2): 170-179, 2010.
- Flemming, Walther (1879). "Beitrage zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen". *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. 16 (1): 302-434, 1879.
- Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet*. 8:1947, 1999.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 63(2):378-83, 1969.
- GeneReviews: 22q11.2 Deletion Syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1523/> (dezembro de 2012).
- GeneReviews: Angelman Syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1144/> (dezembro de 2012)
- GeneReviews: Smith-Magenis Syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1310/> (dezembro de 2012).
- GeneReviews: Sotos Syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1479/> (acesso em dezembro de 2012).
- GeneReviews:Williams Syndrome <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1479/> (acesso em dezembro de 2012).
- Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, Nicholls RD. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol Hum Reprod*. 3:321-32, 1997.
- Glöckner G, Schmidt O, et al. Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat Genet*. 24:71, 2000.
- Graham, John M. Smith's recognizable patterns of human deformation. 3rd ed. PA, Elsevier, 2007.
- Greenberg F, Stratton RF, Lockhart LH, et al. Familial Miller-Dieker syndrome associated with pericentric inversion of chromosome 17. *Am J Med Genet*. 23:853, 1986.
- Gropman AL, Duncan WC, Smith AC. Neurologic and developmental features of the Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Pediatr Neurol*. 34:337, 2006.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 3;1(1):4. doi: 10.1186/1755-8417-1-4, 2008.

Hall BD, Langer LO, Giedion A, et al. Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*.10:147, 1974.

Hammond, P.; Hannes, F.; Suttie, M.; Devriendt, K.; Vermeesch, J. R.; Faravelli, F.; Forzano, F.; Parekh, S.; Williams, S.; McMullan, D.; South, S. T.; Carey, . C.; quarrell, O. Fine-grained facial phenotype–genotype analysis in Wolf–Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet*. 20: 33–40, 2012.

Hancarova M, Vejvalkova S, Trkova M, Drabova J, Dleskova A, Vlckova M, Sedlacek Z. Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15. *Gene*. Dec 22. doi:pii: S0378-1119(12)01538-7. 10.1016/j.gene.2012.12.027, 2012.

Hanley-Lopez J, Estabrooks LL, Stiehm R. Antibody deficiency in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Pediatr*.133:141, 1998.

Hennekam RC, Lommen EJ, Strengers JL, et al. Rubinstein-Taybi syndrome in a mother and son. *Eur J Pediatr*. 148:439-401, 1989.

Hennekam RC. Bibliography on Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet Suppl*. 6:77-83, 1990.

Hennekam RC. Rubinstein-Taybi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 14:981, 2006.

Hirschhorn K. A short history of the initial discovery of the Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2008 v.148C, p.244 – 245. Izumi, K.; Okuno, H.; Maeyama, K.; Sato, S.; Yamamoto, T.; Torii, C.; Kosaki, R.; Takahashi, T.; Kosaki, K. Interstitial microdeletion of 4p16.3: contribution of WHSC1 haploinsufficiency to the pathogenesis of developmental delay in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 152A(4):1028-32, 2010.

ISCN(2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Eds. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. S. Karger, Basel , 2013.

Izumi K, Santani AB, Deardorff MA, Feret HA, Tischler T, Thiel BD, Mulchandani S, Stolle CA, Spinner NB, Zackai EH, Conlin LK. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 15 in Prader-Willi syndrome: Utility of genome-wide SNP array. *Am J Med Genet A*. 161(1):166-71, 2013.

Jacobs PA, Strong. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183(4657):302-3,1959.

Jones KL, Gilbert EF, Kaveggia EG, Opitz JM. The Miller-Dieker syndrome. *Pediatrics* 66:277, 1980.

Jones, KL, Smith, DW. The Williams elfin facies syndrome. *J Pediatr*. 86:718-23, 1975.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818-21, 1992.

- Kamimura J, Endo Y, Kurotaki N, Kinoshita A, Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Visser R, Ohashi H, Miyakawa K, Gerritsen J, Innes AM, Lagace L, Frydman M, Okamoto N, Puttinger R, Raskin S, Resic B, Culic V, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Niikawa N, Matsumoto N. Identification of eight novel NSD1 mutations in Sotos syndrome. *J Med Genet.* 40(11):e126, 2003.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet.* 15:70, 1997.
- Kumar S, Suthar R, Panigrahi I, Marwaha RK. Rubinstein-Taybi syndrome: Clinical profile of 11 patients and review of literature. *Indian J Hum Genet.* 18(2):161-6, 2012.
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet.* 30:365, 2005.
- Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, et al. Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet.* 14:535, 2005.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 39(7 Suppl):S48-54, 2007.
- Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 12:e8, 2010.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin MR. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Acad Sci (Paris).* 248:1721-1722, 1959.
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 18;257:3098-102, 1963.
- Lichtner P, König R, Hasegawa T, et al. An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet.* 37:33, 2000.
- Lim CT, Choo KE, Afzal MK. Cardiofacial syndrome--report of a case with short annoxation. *J Singapore Paediatr Soc.* 20:232, 1978.
- Lischner HW, Dacou C, DiGeorge AM. Normal lymphocyte transfer (NLT) test: negative response in a patient with congenital absence of the thymus. *Transplantation* 5:555, 1967.
- Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schröck E, Ried T. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet.* 14(3):312-5, 1996.
- Lüdecke HJ, Wagner MJ, Nardmann J, La Pillo B, Parrish JE, Willems PJ, Haan EA, Frydman M, Hamers GJ, Wells DE, et al. Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome. *Hum Mol Genet.* 4(1):31-6, 2010.
- Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 1(6):e49, 2005.

- Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 14(10):417-22, 1998.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, et al. Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* 337:694, 1991.
- Marler JA, Sitcovsky JL, Mervis CB, et al. Auditory function and hearing loss in children and adults with Williams syndrome: cochlear impairment in individuals with otherwise normal hearing. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C:249, 2010.
- Matsumoto N, Kitani R, Kalinec F. Linking LIMK1 deficiency to hyperacusis and progressive hearing loss in individuals with Williams syndrome. *Commun Integr Biol.* 4(2):208-10, 2010.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet.* 15:74, 1997.
- Mergener R. Análise citogenética molecular em uma amostra de indivíduos com síndrome de Wolf-Hirschhorn. *Monografia Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina)* – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2012.
- Mervis CB, John AE. Cognitive and behavioral characteristics of children with Williams syndrome: implications for intervention approaches. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C:229, 2010.
- Misceo D, Barøy T, Helle JR, Braaten O, Fannemel M, Frengen E. 1.5Mb deletion of chromosome 4p16.3 associated with postnatal growth delay, psychomotor impairment, epilepsy, impulsive behavior and asynchronous skeletal development. *Gene* 507(1):85-91, 2012.
- Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol.* 105(11):1617-24, 2010.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 20:613-6, 1960.
- Morris CA, Demsey S, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: Physical Characteristics. *J Pediatr.* 113: 318-26, 1988.
- Morris CA, Leonard CO, Dilts C, Demsey SA. Adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet Suppl.* 6: 102-7, 1990.
- Morris CA, Lu X, Greenberg F. Syndromes identified in patients with a previous diagnosis of Williams syndrome who do not have elastin deletion. *Proc Greenwood Genet Cent.* 17: 116-7, 1998.
- Morris CA, Thomas IT, Greenberg E. Williams syndrome; autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet.* 47: 478-81, 1993.
- Morris CA. Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C(2):203-8, 2010.
- Murthy SK, Nygren AO, El Shakankiry HM, et al. Detection of a novel familial deletion of four genes between BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region by oligo-array CGH in a child with neurological disorder and speech impairment. *Cytogenet Genome Res.* 116:135, 2010.

- Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, et al. Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet.* 40:285, 2010.
- Nagamani SC, Zhang F, Shchelochkov OA, et al. Microdeletions including YWHAE in the Miller-Dieker syndrome region on chromosome 17p13.3 result in facial dysmorphisms, growth restriction, and cognitive impairment. *J Med Genet.* 46:825, 2009.
- Nicholls RD, Jong MT, Glenn CC, Gabriel J, Rogan PK, Driscoll DJ, Saitoh S. Multiple imprinted genes associated with Prader-Willi syndrome and location of an imprinting control element. *Acta Genet Med Gemellol.* 45:87-9, 1996.
- Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342: 281-85, 1989.
- Niebuhr, E. The cat cry syndrome (5p-) in adolescents and adults. *J Ment Defic Res.* 15: 277-291, 1971.
- Nimura, K.; Ura, K.; Kaneda, Y. Histone methyltransferases: regulation of transcription and contribution to human disease. *J Mol Med.* 88: 1213–1220, 2009.
- Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 25: 85-109, 1960.
- Omim. Online Mendelian Inheritance in Man. URL:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- Osório A, Cruz R, Sampaio A, Garayzábal E, Carracedo A, Fernández-Prieto M. Cognitive functioning in children and adults with Smith-Magenis syndrome. *Eur J Med Genet.* 55(6-7):394-9, 2012.
- Pagon RA, Bennett FC, LaVeck B, Stewart KB, Johnson J. Williams syndrome: features in late childhood and adolescence. *Pediatrics* 80:85-91, 1987.
- Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool.* 37:291–321, 1923.
- Palmer SJ, Taylor KM, Santucci N, Widagdo J, Chan YK, Yeo JL, Adams M, Gunning PW, Hardeman EC. GTF2IRD2 from the Williams-Beuren critical region encodes a mobile-element-derived fusion protein that antagonizes the action of its related family members. *J Cell Sci.* 125(Pt 21):5040-50, 2012.
- Palumbo O, Palumbo P, Palladino T, Stallone R, Miroballo M, Piemontese MR, Zelante L, Carella M. An emerging phenotype of interstitial 15q25.2 microdeletions: clinical report and review. *Am J Med Genet A.* 158A(12):3182-9, 2012.
- Parrish JE, Wagner MJ, Hecht JT, et al. Molecular analysis of overlapping chromosomal deletions in patients with Langer-Giedion syndrome. *Genomics* 1:54, 1991.
- Pérez SA, Trives IM, Azorín IP, Alcaraz Más L, Pérez Lledó E, Galán Sánchez F. 15q11.2 (BP1-BP2) microdeletion, a new syndrome with variable expressivity. *An Pediatr (Barc).* 75(1):58-62, 2011.
- Peters SU, Beaudet AL, Madduri N, Bacino CA. Autism in Angelman syndrome: implications for autism research. *Clin Genet.* 66:530, 2004.

Pilz DT, Macha ME, Precht KS, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis with LIS1 specific probes reveals a high deletion mutation rate in isolated lissencephaly sequence. *Genet Med.* 1:29, 1998.

Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1:151-7, 1986.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo W-L, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung B-M, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet.* 20(2):207-211, 1998.

Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med.* 362:239, 2010.

Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P, Lupski JR. Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med;* 5:430. 2003.

Rauch, A.; Schellmoser, S.; Kraus, C.; Doè rr, H. G.; Trautmann, U.; Altherr, M.R.; Pfeiffer, R. A.; Reis, A. First Known Microdeletion Within the Wolf-Hirschhorn-Syndrome Critical Region Refines Genotype-Phenotype Correlation. *Am J Med Genet.* 99: 338-342, 2001.

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* 23.444(7118):444-54, 2006.

Riegel M. Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array-CGH). In:Maluf WS e Riegel M. Citogenética Humana. 1. ed. Porto Alegre: Artmed. 2011.

Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr.* 147:90-6. 2005.

Robinson WP, Christian SL, Kuchinka BD, Peñaherrera MS, Das S, Schuffenhauer S, Malcolm S, Schinzel AA, Hassold TJ, Ledbetter DH. Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin Genet.* 57(5):349-58, 2000.

Roelfsema JH, White SJ, Ariyürek Y, et al. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet.* 76:572, 2005.

Roos L, Jønch AE, Kjaergaard S, Taudorf K, Simonsen H, Hamborg-Petersen B, Brøndum-Nielsen K, Kirchoff M. A new microduplication syndrome encompassing the region of the Miller-Dieker (17p13 deletion) syndrome. *J Med Genet.* 46(10):703-10, 2009.

Rosa RF, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, Koshiyama DB *et al.* 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *Am J Med Genet.* 146A:1655-61, 2008.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243(5405):290-3, 1973.

Rubinstein JH, Taybi H. Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child*.105:588, 1963.

Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet*. 43:512, 2006.

Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, et al. Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet*. 68:195, 1997.

Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, et al. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet*.13:417, 2004.

Sakurai T, Dorr NP, Takahashi N, et al. Haploinsufficiency of Gtf2i, a gene deleted in Williams Syndrome, leads to increases in social interactions. *Autism Res*. 4:28, 2011.

Sartori S, Anesi L, Polli R, Toldo I, Casarin A, Drigo P, Murgia A. Angelman syndrome due to a novel splicing mutation of the UBE3A gene. *J Child Neurol*. 23:912-5, 2008.

Schiff M, Delahaye A, Andrieux J, et al. Further delineation of the 17p13.3 microdeletion involving YWHAE but distal to PAFAH1B1: four additional patients. *Eur J Med Genet*. 53:303, 2010.

Schinzl A, Riegel M, Baumer A. Microdeletion Syndromes. In: Ed. Cooper DN et al.. (Org.). Nature Encyclopedia of the Human Genome (Nature EHG). London and New York: Macmillan Publishers Ltd, *Nature Publishing Group* 4, p. 950-954, 2003.

Schinzl A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. 2.ed. Berlin: Walter de Gruyter, 2000.

Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet*. 101:255,1997.

Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 66(7):1178-97, 2009.

Scott RW, Olson MF. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med (Berl)*. 85(6):555-68, 2007.

Sempere Pérez A, Manchón Trives I, Palazón Azorín I, Alcaraz Más L, Pérez Lledó E, Galán Sánchez F. 15Q11.2 (BP1-BP2) microdeletion, a new syndrome with variable expressivity]. *An Pediatr (Barc)*. 75(1):58-62, 2011.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet*. 9:489, 2000.

Shaikh TH. Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med*. 9(9):617-25, 2007.

- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 1;13 Spec No 1:R57-64, 2004.
- Sheth F, Gohel N, Liehr T, Akinde O, Desai M, Adeteye O, Sheth J. Gain of chromosome 4qter and loss of 5pter: an unusual case with features of cri du chat syndrome. *Case Rep Genet.* 2012:153405. doi: 10.1155/2012/153405. Epub 2012 Dec 20, 2010.
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J.* 15:56, 1978.
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. In: Cassidy SB, Allanson J, editors. Management of genetic syndromes. New York: Wiley; p. 495-517, 2005.
- Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M. *Biochem Biophys Res Commun.* 26;242(3):685-91, 1998.
- Sinderberry B, Brown S, Hammond P, Stevens AF, Schall U, Murphy DG, Murphy KC, Campbell LE. Subtypes in 22q11.2 deletion syndrome associated with behaviour and neurofacial morphology. *Res Dev Disabil.* 34(1):116-25, 2013.
- Smith AC, Dykens E, Greenberg F. Sleep disturbance in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Am J Med Genet.* 81:186, 1998.
- Smith ACM, McGavran L, Waldstein G. Deletion of the 17 short arm in two patients with facial clefts. *Am J Hum Genet.* 34:410A, 1982.
- Smith AD, Gilchrist ID, Hood B, Tassabehji M, Karmiloff-Smith A. Inefficient search of large-scale space in Williams syndrome: further insights on the role of LIMK1 deletion in deficits of spatial cognition. *Perception* 38(5):694-701, 2009.
- Smith, A.C.; Dykens, E.; Greenberg, F. Behavioral phenotype of Smith- Magenis syndrome (del 17p11.2). *Am J Med Genet.* 81:179-185, 1998.
- Snyder JR, Berk DR, Kwan A, Hudgins L, Bruckner AL. What is your diagnosis? Trichorhinophalangeal syndrome type I. *Cutis.* 89(2):56, 73-4, 2010.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20(4):399–407, 1997.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 61:437-55, 2010.
- Stevens CA, Carey JC, Blackburn BL. Rubinstein-Taybi syndrome: a natural history study. *Am J Med Genet Suppl.* 6:30-7, 1990.
- Stratton RF, Dobyns WB, Airhart SD, Ledbetter DH. New chromosomal syndrome: Miller-Dieker syndrome and monosomy 17p13. *Hum Genet.* 67:193, 1984.
- Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol.* 17:269–271, 2002.

Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Chandler K, Clarke A, Collins A, Davies S, Faravelli F, Firth H, Garrett C, Hughes H, Kerr B, Liebelt J, Reardon W, Schaefer GB, Splitt M, Temple IK, Waggoner D, Weaver DD, Wilson L, Cole T, Cormier-Daire V, Irrthum A, Rahman N. Multiple mechanisms are implicated in the generation of 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. Childhood Overgrowth Collaboration. *J Med Genet.* 42(4):307-13, 2005.

Tatton-Brown K, Rahman N. Sotos syndrome. *Eur J Hum Genet.* 15(3):264-71, 2007.

Taylor L, Oliver C. The behavioral phenotype of Smith-Magenis syndrome: evidence for a gene-environment interaction. *J Intellect Disabil Res.* 52(10):830-41, 2008.

Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, Minot D, Mosca Anne L, Marle N, Sanlaville D, Bonnet M, Masurel-Paulet A, Levy F, Gaunt L, Farrell S, Le Caignec C, Toutain A, Carmignac V, Mugneret F, Clayton-Smith J, Thauvin-Robinet C, Faivre L. 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with childhood apraxia of speech. *Eur J Hum Genet.* 21(1):82-8, 2013.

Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man. *Heredita* 42:1-6, 1956.

Tsai AC, Dossett CJ, Walton CS, et al. Exon deletions of the EP300 and CREBBP genes in two children with Rubinstein-Taybi syndrome detected by aCGH. *Eur J Hum Genet.* 19:43,2011.

Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet.* 65(2):448-62, 1999.

Van Hagen JM, van der Geest JN, van der Giessen RS, Lagers-van Haselen GC, Eussen HJ, Gille JJ, Govaerts LC, Wouters CH, de Coo IF, Hoogenraad CC, Koekkoek SK, Frens MA, van Camp N, van der Linden A, Jansweijer MC, Thorgerisson SS, De Zeeuw CI. Contribution of CYLN2 and GTF2IRD1 to neurological and cognitive symptoms in Williams Syndrome. *Neurobiol Dis.* 26(1):112-24, 2007.

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

VanTuinen P, Dobyns WB, Rich DC, et al. Molecular detection of microscopic and submicroscopic deletions associated with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet.* 43:587, 1988.

Vergult S, Dauber A, Delle Chiaie B, Van Oudenhove E, Simon M, Rihani A, Loeys B, Hirschhorn J, Pfothenauer J, Phillips JA 3rd, Mohammed S, Ogilvie C, Crolla J, Mortier G, Menten B. 17q24.2 microdeletions: a new syndromal entity with intellectual disability, truncal obesity, mood swings and hallucinations. *Eur J Hum Genet.* 20(5):534-9, 2012.

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 15(11):1105-14, 2007.

Vieira GH, Rodriguez JD, Carmona-Mora P, Cao L, Gamba BF, Carvalho DR, de Rezende Duarte A, Santos SR, de Souza DH, DuPont BR, Walz K, Moretti-Ferreira D, Srivastava AK. Detection of classical 17p11.2 deletions, an atypical deletion and RAI1 alterations in patients with features suggestive of Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet.* 20(2):148-54. 2012.

- Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol.* 838:29-75, 2012.
- Vlangos CN, Wilson M, Blancato J, Smith ACM, Elsea SH. Diagnostic FISH probes for del 17(p11.2p.11.2) associated with Smith-Magenis syndrome should contain the RAI1 gene. *Am J Med Genet A.* 132A(3):278-82, 2005.
- White HE, Hall VJ, Cross NC. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clin Chem.* 53:1960-2, 2007.
- Widagdo J, Taylor KM, Gunning PW, Hardeman EC, Palmer SJ. SUMOylation of GTF2IRD1 regulates protein partner interactions and ubiquitin-mediated degradation. *PLoS One.* 7(11):e49283, 2012.
- Wiley S, Swayne S, Rubinstein JH, Lanphear NE, Stevens CA. Rubinstein-Taybi syndrome medical guidelines. *Am J Med Genet A.* 119A(2):101-10, 2003.
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, et al. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet.* 56:237, 1995.
- Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, et al. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet A.* 140:413, 2006.
- Williams SR, Girirajan S, Tegay D, Nowak N, Hatchwell E, Elsea SH. Array comparative genomic hybridisation of 52 subjects with a Smith-Magenis-like phenotype: identification of dosage sensitive loci also associated with schizophrenia, autism, and developmental delay. *J Med Genet.* 47(4):223-9, 2010.
- Wilson WG, Herrington RT, Aylsworth AS. The Langer-Giedion syndrome: report of a 22-year old woman. *Pediatrics* 64:542, 1979.
- Xu YJ, Wang J, Xu R, Zhao PJ, Wang XK, Sun HJ, Bao LM, Shen J, Fu QH, Li F, Sun K. Detecting 22q11.2 deletion in Chinese children with conotruncal heart defects and single nucleotide polymorphisms in the haploid TBX1 locus. *BMC Med Genet.* 12:169, 2011.
- Yoon Cho S, Ki CS, Bae Sohn Y, Hyun Maeng S, Jin Jung Y, Jin Kim S, Jin DK. The proportion of uniparental disomy is increased in Prader-Willi syndrome due to an advanced maternal childbearing age in Korea. *J Hum Genet.* Jan 10. doi: 10.1038/jhg.2012.148, 2013.
- Yuan Y, Singh D, Arikath J. Mef2 promotes spine elimination in absence of δ -catenin. *Neurosci Lett.* Jan 14. pii: S0304-3940(13)00016-5. doi: 10.1016/j.neulet, 2013.
- Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science.* 26;191(4233):1268-70, 1976.
- Zeesman S, Kjaergaard S, Hove HD, Kirchhoff M, Stevens JM, Nowaczyk MJ. Microdeletion in distal 17p13.1: a recognizable phenotype with microcephaly, distinctive facial features, and intellectual disability. *Am J Med Genet A.* 158A(8):1832-6, 2012.
- Zeschnick M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet.* 6:387-95, 1997.

Zhang X, Snijders A, Segraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 76(2):312-26, 2005.

Zollino M, Murdolo M, Marangi G, et al. On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 148C:257, 2008.

Molecular cytogenetic studies of chromosomal microdeletions: the experience of a public hospital from Southern Brazil

Barcellos N¹, Mergener R², Leite JCL⁴, Maluf S⁴, Giugliani R^{1,2,3,4}, Riegel M^{2,3,4}

¹ Post Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Gene Therapy Center, Research Center, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to:

Mariluce Riegel

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Phone + 55 51 3359-8011

Fax: + 55 51 3359-8011

E-mail: mariluce.riegel@gmail.com

ABSTRACT

Background: During the past decades, the widespread use of FISH and microarray-based technologies dramatically changed our perspective regarding detection of submicroscopic genomic rearrangements. The number of diseases identified as caused by chromosomal microdeletions/microduplications increased quickly, bringing a new and crucial role for cytogenetics in the diagnosis of these conditions. **Objective:** The purpose of this study was to identify and characterize chromosomal microdeletions associated with malformation syndromes in a reference cytogenetics laboratory from a public hospital of Southern Brazil. **Methods:** Using retrospective and prospective approaches, we evaluated a consecutive series of samples. The study was based in hospital and laboratorial records of samples from a cohort of subjects with clinical suspicion of a chromosomal microdeletion. We selected samples from subjects in whom a clinical diagnosis was proposed, which included deletion of chromosomes 4p16.3, 5p15.2, 5q35, 7q11.23, 8q24.12, 15q11-q12, 16p13.3, 17p13.3, 17p11.2,2 and 22q11 identified by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. In 11 samples with microdeletions, array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) was performed. **Results:** A total of 504 samples were evaluated, being the most common suspicions the 22q11.2 deletion (29.5%), the Prader-Willi syndrome (21.6%), the Williams-Beuren syndrome (15%) and the Angelman syndrome (13%). In 120 of them (23.8%) chromosomal imbalances related to the clinical diagnosis were found. The deletion 7q11.23 was the most frequently finding (8.5%), followed by del22q11.2 (5.3%) and del15q11-q12 (4.5%). **Conclusions:** Our findings provide support to the idea that a sensitive molecular cytogenetic test associated with a qualified clinical evaluation are crucial for the detection and precise characterization of submicroscopic

chromosome deletions. Additionally, our study emphasizes the need of continuing education for the improvement of the cytogenetic diagnosis technology, which was successfully introduced in a public hospital of Southern Brazil.

Key words: chromosomal microdeletion, FISH, array-CGH, microdeletion syndrome, molecular cytogenetics

INTRODUCTION

The phenotypic spectrum observed in some disorders can be attributed to the malfunction (deletion, duplication, disruption, or point mutation) of a single dosage-sensitive gene. The lack of a protein encoded by one allele of a gene with the reduction of the amount of the protein to approximately 50% is termed haploinsufficiency, a state in which a decreased level of the protein is insufficient to sustain its normal function, leading to an abnormal phenotype. The clinical pictures of the well-known microdeletion syndromes, which are a consequence of submicroscopic chromosome deletion that leads a haploinsufficiency, are relatively specific and its phenotypic characteristics were often recognized before the causal microdeletion were actually identified [1]. In 1986, the term “contiguous gene syndromes” was proposed for a group of disorders characterized by microdeletions or microduplications of chromosomal segments associated with clusters of single gene disorders [2]. In contrast to the single gene disorders, these conditions, specially those including developmental delay/intellectual disability and congenital developmental abnormalities, result from submicroscopic chromosome rearrangements encompassing several genes, with at least two of them being dosage-sensitive but typically functionally unrelated to each other [3].

In such contiguous gene deletions (e.g. Williams-Beuren syndrome, Prader-Willi syndrome, Angelman syndrome, 22q11.2 deletion syndrome) the phenotype of the disorder results from an inappropriate dosage of only the dosage-sensitive genes located within the rearranged genomic region. In the past 15 years, technological advances, such as array-based comparative genomic hybridization (aCGH) [4;5], have enabled the detection of intermediate size range rearrangements which resulted in a previously unrecognized large scale of structural genomic variation known as copy-number

variation (CNV)[6]. The most common mechanism of conveying a phenotype by microdeletion or microduplication is altering the copy-number of a dosage-sensitive gene(s) located within the rearranged region [7].

Improvements in cytogenetic techniques over the past 30 years allowed the increasingly sensitive detection of chromosome constitutional rearrangements, including deletions and duplications related to genomic disorders. However, the resolution of banding analysis is such that can only detect rearrangements that involve at least 3 Mb of DNA. The introduction of FISH in the late 1980's, as a technique that can readily detect submicroscopic chromosome rearrangements that involve regions smaller than 3 Mb made it a powerful technique with broad application in cytogenetics laboratory, becoming of enormous value for the diagnosis and research of chromosomal rearrangements.

The purpose of this study was to identify and characterize chromosomal microdeletions associated with malformation syndromes in a reference cytogenetics laboratory from a public hospital of Southern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

This study (with retrospective and prospective approaches) included cases referred from July 1998 until December 2012 for investigation at the molecular cytogenetics laboratory at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS state, Brazil. Samples from a cohort of 504 patients were studied through molecular cytogenetic analysis. Most samples selected had been previously analysed by karyotype of peripheral blood lymphocytes using the Giemsa banding technique, being the chromosomal constitution described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013)[8]. Results of previous cytogenetic analyses were obtained for almost all cases, except for those in which no karyotype was available at the time of selection. To be included in the study subjects needed to have clinical suspicion of a specific chromosomal microdeletion. Cases with suspicion of a non specified clinical microdeletion, cases whose medical records were not available, or cases whose samples were not available for investigation by FISH were ineligible. Information about the cases was retrieved from multiple hospital records and final cytogenetic and clinical reports were reviewed by a cytogeneticist (MR) and by a clinical geneticist (JCLL).

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescence in situ Hybridization (FISH) experiments were carried out by standard techniques in all cases using commercially available locus-specific probes (Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois, EUA and Cytocell[®] – Cambridge) for the following regions: 4p16.3(*WHSCR*); 5p15.2 (D5S23, D5S721); 5q35 (*NSD1*); 7q11.2(*ELN/LIMK1/D7S613*); 8q23.3(*TRPS1*) and 8q24.11-8q24.12 (*EXT1*); 15q11-

q13(*SNRPN*);16p13.3 (*CREBBP*); 17p13.3(*LSI1*);17p11.2(*RAI1*) and 22q11.2(*TUPLE1*). Hybridizations were analyzed with an epifluorescence microscope, and images captured with a CCD camera. At least 30 cells were analyzed per hybridization. We considered a chromosome region deleted when the FISH signal from the corresponding probe was absent on one of the homologue chromosomes.

Chromosomal microarray analysis

In order to better define some of the chromosomal rearrangements detected at FISH analysis the critical region of eleven DNA samples, del4p16.3(6), 5p15.2(5) and del8q24.12(1) was further mapped. Whole-genome array-CGH was performed using a 60-mer oligonucleotide-based microarray with a theoretical resolution of 40 kb (8x60K, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). Labelling and hybridization were performed following the standard protocols provided by Agilent, version 2011. The arrays were analyzed through the microarray scanner (G2600D) and the Feature Extraction software (v9.5.1) (both from Agilent Technologies). Imaging analyses were performed using Agilent Genomic Workbench Lite Edition 6.5.0.18 with the statistical algorithm ADM-2, sensitivity threshold 6.0.

Ethics Review

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and was conducted in accordance with all current rules of the institution [9] as of the Review Boards of the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development.

RESULTS

During a 14-year period, 1033 samples were referred to molecular cytogenetic analysis at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A total of 541 cases had a suspicion or a clinical diagnosis of microdeletion syndrome. Of these, 504 were included in the present study, as 37 cases did not meet the selection criteria. Of the 504 subjects included in the final sample, 256 (50.8%) were female, and the age range of individuals at onset of FISH analysis varied from 1 day to 49 years. The majority of the subjects were originated from the State of Rio Grande do Sul (96%), being 57 % from small countryside towns. The most relevant clinical features related with the samples investigated in the present study were collected based on multiple hospital records and are summarized in Table 1.

The most common conditions suspected on clinical grounds were the 22q11 deletion (22q11DS) (29.5%), the Prader-Willi syndrome (PWS) (21.6%), the Williams-Beuren syndrome (WBS) (15%) and the Angelman syndrome (AS) (13%), followed by the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) (6.7%), Sotos syndrome (SoS) (2.7%), Cri-du-Chat syndrome (CdCS) (3%) and Miller-Diecker syndrome (MDS) (3%), Smith-Magenis syndrome (SMS) (2%), Langer-Giedion syndrome (LGS) (1.6%) and Rubinstein-Taybi syndrome (RTS) (1.6%) (Table I).

Of the 504 cases included in our study, 472 (93.6%) have performed conventional cytogenetic karyotype (peripheral blood) and abnormalities were observed in 19 (3.7%) (Table I). The deletion of chromosome 5p15.2 (CdCS) and of chromosome 4p16.3 (WHS) were the most common abnormalities detected through the karyotype. Abnormal karyotypes in patients with LGS (del8q24.12), 22qDS (+21), MDS

(del17p13.3) and PWS (invdup15q11.2) were also reported (data not shown). In 32 (6.3%) the result of the karyotype was not available.

In the 504 samples, the deletion 7q11.23 was the most frequent (8.5%) abnormality detected, followed by the deletion of chromosome 22q11.2 (5.3%), del15q11-q12 (4.5%), del4p16.3 (3%), del5p15.2 (1.4%), del17p13.3 (0.4%) and del8q24.12 (0.2%). FISH investigations were normal for the samples of patients with SoS, RTS and SMS (Table II).

Considering each group of samples separately, the FISH analysis identified the del4p16.3 abnormality in 15/34 (44%) of WHS samples, the del5p11.2 in 7/15 (46.5%) of CdCS samples, the del7q11.23 in 43/76 (56.5%) of WBS samples, the del8q24.12 in 1/8 LGS samples, the del15q11-q12 in 10/65 (15.4%) of AS samples, the del17p13.3 in 2/16 (12.5%) of MDS samples and the del22q11.2 in 27/149v(18%) of the 22qDS samples (Table II).

The array-CGH analysis of six samples with del4p16.3, five samples with del5p15.2 and one sample with del8q24.12 was performed with the aim to determine the approximate size of the deleted region and to map the critical region. In the six samples where a del4p16.3 was confirmed by FISH, five showed a terminal 4p deletion between 3.7 and 14.7 Mb and one showed a 11 Mb interstitial deletion (Riegel M, unpublished results). The five 5p15.2 classical terminal deletions sized between 11.2 and 18.4 Mb (Riegel M, personal observation). The microarray analysis showed a single copy loss of the long arm of chromosome 8 at bands q23.3 through q24.12 which is approximately 6.43 Mb in size, including the deletion of the *EXT1* and *TRPS1* genes [arr 8q23.3q24.12(116,002,879-121,241,253) x1 (Riegel M, Moreira LMA, unpublished

results). Map position is based on the UCSC Genome Browser, Feb. 2009, gh19 (NCBI Build GRCH37 reference sequence).

Regarding the number of cases with molecular cytogenetic investigation for the detection of chromosomal microdeletion, this study showed a significant increase in the percentage of cases with molecular cytogenetic investigations according to the period of diagnosis: 15.5% between 1998-2003, 33.3% between 2004-2008 and 51% between 2009-2012.

Table I. Data set of selected samples from subjects with clinical suspicion of microdeletion syndromes at onset of FISH analysis.

<i>Syndrome</i>	<i>OMIM</i>	<i>Age range</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>Most frequent clinical features reported in the hospital records</i>	<i>Karyotype</i>			<i>n</i>
						<i>N</i>	<i>A</i>	<i>NA</i>	
AS	105830	1y-28y	28	37	DD/ID, ataxic gait, inappropriately happy effect, hypotonia, microcephalia, profound speech impairment, seizures	65	-	-	65
CdCS	123450	4m-35y	6	9	High-pitched monotonous cry microcephaly, hypertelorism epicanthic folds, round face severe DD and learning disabilities	8	7	-	15
LGS	190351	4m-20y	5	3	Long flat philtrum, ID, exostosis	6	1	1	8
22qDS	188400 192430	NB- 40y	74	75	Congenital heart defects/ Conotruncal and aortic arch, facial dysmorphic features, DD	131	2	17	149
MDS	247200	2m-30y	11	5	microcephaly, growth retardation, DD/ID with seizures and EEG abnormalities	15	1	-	16
PWS	176270	3m-43y	50	59	ID, postnatal hipotonia, obesity due to food seeking, hypogonadotrophic hypogonadism	96	1	11	109
RTS	180849	1y-49y	6	2	ID, broad thumbs and toes facial dysmorphism	8	-	-	8
SoS	606681	NB-17y	7	7	DD, increased birth length and weight, excessive growth in childhood,	13	-	1	14
WBS	194050	1m-39y	41	35	DD/ID, overfriendliness, congenital heart disease, facial characteristic including bulbous nasal tip, wide mouth, full lips, full cheeks and small widely spaced teeth	76	-	-	76
WHS	194190	NB-39y	15	19	A Greek-helmet”profile, low birth-weight and postnatal failure to thrive, microcephaly, DD.	25	7	2	34
SMS	182290	3y-19y	5	5	DD, learning disability, behavioral disturbance, facial characteristics	10	-	-	10
Total (%)	-	-	248(49.2)	256(50.8)	DD/ID	453(90)	19(3.7)	32(6.3)	504(100)

AS, Angelman syndrome; CdCS, Cri-du-Chat syndrome; LGS, Lager Giedion syndrome; 22qDS, 22q11 deletion syndrome; MDS, Miller-Diecker syndrome; PWS, Prader-Willi syndrome; RTS, Rubinstein Taybi syndrome; SoS, Sotos syndrome; WBS, Williams-Beuren syndrome; WHS, Wolf-Hirschhorn syndrome; SMS, Smith-Magenis syndrome; OMIM, Online Mendelian Inheritance in man; nb, newborn; m, months, y, years; DD, developmental delay; ID, intellectual disability; M, male; F, female; NA: not available; N: normal; A: abnormal; n: total; NB: newborn

Table II. Total of microdeletion cases investigated according to the critical region.

<i>Locus</i>	<i>Syndrome</i>	<i>Total(%)</i>	<i>Normal FISH</i>	<i>Abnormal FISH</i>	
				<i>del</i>	<i>dup</i>
4p16.3	Wolf-Hirschhorn	34 (6.7)	18	15	1
5p15.2	Cri-du-Chat	15 (3)	8	7	-
5q35	Sotos	14 (2.7)	14	-	-
7q11.23	Williams-Beuren	76 (15)	33	43	-
8q24.12	Langer-Giedion	8 (1.6)	7	1	-
15q11-q12	Angelman	65 (13)	55	10	-
15q11.2-q12	Prader Willi	109 (21.6)	95	13	1
16p13.3	Rubinstein-Taybi	8 (1.6)	8	-	-
17p13.3	Miller-Diecker	16 (3.2)	14	2	-
17p11.2	Smith-Magenis	10 (2)	10	-	-
22q11.2	del 22q11.2	149 (29.5)	122	27	-
Total(%)	All syndromes	504 (100)	384(76)	118(23.4)	2(0.4)

del:deletion; dup:duplication.

Table III. Total of microdeletion cases investigated according to the period of FISH diagnosis

<i>Syndrome</i>	<i>1998-2003</i>	<i>2004-2008</i>	<i>2009-2012</i>	<i>Total,N</i>
Angelman	10	21	34	65
Cri-du-Chat	-	3	12	15
Langer-Giedion	-	6	2	8
del22q11.2	34	52	63	149
Miller-Diecker	-	11	5	16
Prader Willi	11	36	62	109
Rubinstein-Taybi	-	2	6	8
Sotos	-	4	10	14
Williams-Beuren	19	23	34	76
Wolf-Hirschhorn	4	6	24	34
Smith-Magenis	-	4	6	10
Total (%)	78(15.5)	168(33.3)	258(51)	504(100)

DISCUSSION

Microdeletion syndromes are rare clinical entities caused by a chromosomal deletion at the border or below the level of detection by classical banded cytogenetic studies. They may include the sequelae of haploinsufficiency of two or more dominant genes in close proximity (“contiguous gene syndromes”). Cytogenetics plays an important role in the diagnosis of these rare diseases. In Brazil, the most used method to demonstrate the occurrence of a deletion in the molecular cytogenetic diagnostic laboratories are still the fluorescence in situ hybridization (FISH) with cloned segments present within the deleted segment, or the microsatellite analysis for markers within the critical segments.

A total of 504 samples were evaluated and 120 (23.8%) of them were found to have chromosomal imbalances related to the clinical diagnosis of the subjects. Overall, the deletion 7q11.23 was the most frequent (8.5%), followed by the del22q11.2 (5.3%) and the del15q11-q12 (4.5%). Among the suspected clinical diagnosis the most common conditions were the 22q11.2 deletion (29.5%), the Prader-Willi syndrome (21.6%), the Williams-Beuren syndrome (15%) and the Angelman syndrome (13%). The overall frequency of microdeletions remains unknown. In general, genomic disorders at a specific locus occur with similar frequencies in populations. However, significant differences in prevalence across different regions have been encountered for specific syndromes, such as Sotos syndrome [10]. The differences can also be explained, in part, by the diversity of the samples and the methodologies employed.

Considering each group of samples separately, the FISH analysis identified the del4p16.3 in 15/34 (44%) WHS samples, the del5p11.2 in 7/15(46.5%) CdCS samples, the del7q11.23 in 43/76 (56.5%) WBS samples, the del8q24.12 in 1/8 LGS samples, the

del15q11-q12 in 10/65(15.4%) AS samples, the del17p13.3 in 2/16(12.5%) MDS samples and the del22q11.2 in 27/149(18%) 22qDS samples (Table II).

The deletion of chromosome 5p15.2 (CdCS) and of chromosome 4p16.3 (WHS) were the most common abnormalities detected through the karyotype in our selected sample. This is not a surprise since both are classical deletions that can be detected in good quality metaphase chromosomes. With the exception of one case of del8q24.12 and one case of del17p13.3, none of the other microdeletions were detected through standard karyotype. Although some microdeletions such as del8q24.12, del15q11.2, del17p13.3, and del22q11.2 can be detected through high resolution karyotype, the majority will not be confidently recognized using only conventional cytogenetic techniques unless, of course, they occur as unbalanced translocations.

A limitation of the use of FISH to detect microdeletions is that occasional patients with small and unusual deletions may escape detection, depending on the specificity of the fluorescent probe. In addition, the cases with gene mutations or imprinting mutations that occur in some microdeletion syndromes as AS, PWS, SoS, MDS, SMS and RTS cannot be detected by FISH. This should be considered when observing that that we did not detect any microdeletion among the MDS, Sotos and RTS cases. We assume that probably this study failed detect some microdeletions due to the reduced number of cases in specific groups of subjects and/or potentially due to an incorrect suspicion of clinical diagnosis. We should also consider that smaller rearrangements in the critical region in some of our cases potentially were not detected with probes used by FISH. Thus, even if the FISH analysis was normal, we shall not exclude the clinical diagnosis of a microdeletion syndrome.

Until relatively recent times, high-resolution G-banded karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies using probes targeted to known microdeletion loci were considered the gold standard for detecting cytogenetic aberrations. This testing strategy has been strongly challenged by the development of array comparative genomic hybridization (array-CGH), which enables the simultaneous testing of multiple loci for copy number differences. Array-CGH has a much higher sensitivity compared to high-resolution karyotyping and can target more loci than FISH in a cost-effective manner. Furthermore, it is more successful than FISH for the detection of at small chromosomal duplications and atypical microdeletions.

Through this study we mapped the critical region in 11 cases of microdeletions previously detected by FISH. Six samples with del4p16.3, five samples with del5p15.2 and one sample with del8q24.12 were analyzed and we could determine the deletion sizes. Array-CGH analysis made possible a better delineation and more precise mapping of the deletion in the critical region, compared with FISH. We aimed to correlate the phenotypes with deletion sizes in each group. It can be proposed that both methods, used together, are extremely valuable tools for the diagnosis and the study of chromosomal rearrangements and identifications of microdeletions and that the implementation of both techniques should be considered for the molecular cytogenetic investigations [11]. Cytogenetic testing in general is likely to use mostly array-CGH technology in the near future. However, the high cost associated with the cytogenetic molecular methods and the present lack of technical skills and professional experience needed for its application are major challenges for cytogenetic laboratories of public hospitals in emerging countries such as Brazil.

Our study found an upward trend in the number of microdeletion diagnosis over the past years, more than a half (51%) of all microdeletions detected were between 2009

and 2012 which coincided with the efforts to establish new methods and improve the capacity to study chromosomal abnormalities in our laboratory (Table III). Although the number of cases in our study was small for some microdeletions, we observed in all syndromes a significant increase in the number of cases according to the period of the cytogenetic diagnosis. This probably reflects, among several factors, the better knowledge and practical skills obtained along the years towards the improvement of the capacity of pediatricians and clinical geneticist to clinically recognize such disorders.

Clinical evaluation of subjects continues to present a challenge to the clinicians and requires a high degree of experience and expertise. Although some steps in finding the diagnosis are highly formalized, for example, database searches, clinical utility gene cards and standard clinical score, others are not eligible for standardization. The diagnosis of microdeletion syndromes based only on clinical assessments may be difficult because of the great variability of its manifestations.

Laboratory tests to detect the microdeletions are essential to confirm the clinical diagnosis. The confirmation of clinical suspicion of microdeletion syndromes is crucial for the clinical follow-up of the patients and the genetic counseling of the family. Our study reinforces that the effort to improve the capacity to perform molecular cytogenetic diagnosis in the Brazilian public health system and the access of affected subjects to appropriate diagnosis and care, brings benefits to patients, relatives and genetic counselors as well as contributes to the education of cytogeneticists and to the knowledge about chromosomal rearrangements associated with genomic disorders.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Lilia Maria de Azevedo Moreira from the Laboratory of Human Genetics and Mutagenesis of the Federal University of Bahia and Dra. Rejane Gus and to all the clinical geneticists of the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, for their cooperation. This work was supported by the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) grant no. 402012/2010-0 and INAGEMP, Instituto Nacional de Genética Médica Populacional. MR is supported by the CNPq grant no 214906/2012-4. We apologize to colleagues and the authors of relevant papers who could not be cited owing to space limitations.

Competing interests

Non-financial competing interests.

REFERENCES

- 1.Schinzel A, Riegel M, Baumer A. Microdeletion Syndromes. Nature Encyclopedia of Human Genome. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. 2003; 950-954.
- 2.Schmickel RD. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. J Pediatr 1986; 109(2):231-41.
- 3.Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. Methods Mol Biol. 2012; 838:29-75.
- 4.Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998; 20(2):207-11.
- 5.Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997 ; 20(4):399-407.
- 6.Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet. 2004 Sep;36(9):949-51.
- 7.Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 1(6):e49, 2005.
- 8.ISCN(2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Eds. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. S. Karger, Basel , 2013.
9. Fernandes MS, Ashton-Prolla P, Matte U, Meurer L, Osvaldt A, Bittelbrunn AC, Schlatter R, Kucyk R, da Silva FMP, Clausell N, Goldim R. A Normativa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o Armazenamento e Utilização de Materiais

Biológicos Humanos e Informações Associadas em Pesquisa: Uma Proposta Interdisciplinar. Rev. HCPA 2010; 30(2):170-179.

10.Kurotaki e col., 2003 (Vissers and Stankiewicz).

11.Bishop B: Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. Biohorizons 2010,3:85-95.23.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estima-se que a frequência conjunta das microdeleções associadas a quadros clínicos seja superior a 1:1000 indivíduos, ou seja, semelhante à da Síndrome de Down. Um dos grandes desafios da genética médica tem sido a identificação e o diagnóstico de síndromes de Microdeleção/Microduplicação. Esses distúrbios são caracterizados por manifestações clínicas no adulto que em lactentes e crianças em várias situações não são evidentes e dificultam a sua identificação. Na maioria dos casos, existe a necessidade de uma avaliação laboratorial pós-natal que confirme a suspeita clínica. Entretanto, os métodos utilizados para a investigação citogenética a nível molecular, requerem importante investimento em equipamentos e instalações, têm custo relativamente elevado de materiais de consumo e, principalmente, requerem pessoal treinado e capacitado.

Em função desses requerimentos, o número de laboratórios que realizam este tipo de investigação no Brasil é limitado e estão em geral desvinculados da maioria dos serviços públicos no país. Acreditamos que a identificação e caracterização citogenética de 504 casos de microdeleção através desse trabalho seja representativa, principalmente considerando a raridade de cada uma dessas condições individualmente e o possível subdiagnóstico que ocorre no Brasil.

As vantagens de se utilizar a técnica de FISH para o estudo de alterações cromossômicas são: **1.** A resolução do método em detectar alterações submicroscópicas (até 2 Mb); **2.** FISH pode ser utilizado tanto em células em divisão (metáfases) como em células sem divisão celular (interfases); **3.** o protocolo laboratorial exige menor tempo de processamento e análise do que nos métodos de bandeamento cromossômico;

4. FISH com múltiplas sondas permite a detecção e caracterização específica de alterações complexas e alterações estruturais e numéricas.

As desvantagens do FISH são: **1.** o método não é capaz de detectar pequenas mutações, incluindo as deleções, duplicações e inserções bem como mutações de ponto; **2.** dissomias uniparentais não são detectadas porque as sondas utilizadas detectam a presença ou ausência de um locus ou loci em um segmento cromossomo específico, mas não mostra a sua origem parental (origem paterna ou materna) e; **3.** as alterações cromossômicas podem não serem detectadas sem o conhecimento prévio da região a ser investigada ou sem indicação clínica específica. As sondas utilizadas não são específicas para uma precisa localização da ordem das sequencias dentro de um cromossomo.

As principais vantagens da técnica de *array*-CGH, se comparada com as técnicas de citogenética de bandeamento e FISH, são: **1.** não é necessária a obtenção de metáfases, permitindo a análise do DNA extraído de diferentes tipos de tecidos; **2.** o DNA genômico inteiro pode ser analisado em um único experimento, incluindo a capacidade de investigar milhares de regiões cromossômicas em um curto período de tempo e com alta resolução e, **3.** a sensibilidade e a especificidade do método são bastante altas.

Embora o método de *array*-CGH tenha provado ser uma técnica eficiente e reprodutível para o estudo de alterações genômicas, evidenciam-se algumas desvantagens tais como: **1.** a impossibilidade de detectar rearranjos equilibrados (translocações, inserções e inversões) porque nesses não há variação no número de cópias; **2.** a impossibilidade de determinar a ploidia do genoma investigado, não sendo possível diferenciar uma poliploidia de um cariótipo normal; **3.** oníveis de mosaicismo

abaixo de 25% podem não ser detectados. Estas limitações decorrem do princípio geral da metodologia, enquanto que o desempenho de um experimento específico utilizando *array*-CGH depende da qualidade do DNA e do tipo de plataforma de *arrays* empregada, uma vez que o tipo de plataforma utilizada (BACs, oligonucleotídeos, SNPs) e a quantidade de regiões pesquisadas variam entre protocolos distintos.

A análise da amostra evidenciou que a maioria dos indivíduos neste estudo teve uma avaliação citogenética tardia. Em geral, o atraso no diagnóstico citogenético pode ser causado por vários fatores, tais como: o fato de alterações cromossômicas não fazerem parte dos testes de triagem neonatal em neonatos, mesmo considerando apenas o que tem malformações congênitas; o fato do fenótipo dos portadores de microdeleções apresentar uma variabilidade fenotípica, que em certas situações dificulta a definição de um diagnóstico clínico; à falta de familiaridade com o fenótipo diante de um quadro clínico indicativo de microdeleção cromossômica. Soma-se a isso a dificuldade para a realização da investigação laboratorial específica devido à escassez de laboratórios de citogenética molecular e de profissionais especializados nos hospitais públicos do país. No entanto, nosso estudo demonstrou que existe no HCPA uma tendência ao aumento do número de investigações e a um diagnóstico mais precoce, quando os dados mais recentes são comparados com os da década anterior.

O presente estudo teve algumas limitações, tais como o custo elevado de insumos para a realização da parte laboratorial, as informações incompletas e a escassez de informações nos registros hospitalares. Por exemplo, muitos registros não incluíam uma anamnese e/ou exame físico completos. No entanto, essas limitações não diminuem a relevância deste trabalho, pois pode ser traçado um panorama das microdeleções cromossômicas associadas a doenças genômicas diagnosticadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre nos últimos quatorze anos. Acreditamos que as informações obtidas

através deste trabalho trazem uma contribuição importante para o conhecimento da frequência de síndromes de microdeleção no Brasil, o que poderá ser útil não apenas aos geneticistas mas também a outros especialistas, além de contribuir para a associação genótipo-fenótipo dos portadores e para o aconselhamento genético às famílias.

Amostras como a investigada neste estudo continuarão a ser estudadas através da Rede Brasileira de Registro e Informação em Síndromes de Microdeleção (Programa de Ação de Extensão UFRGS 20300/ CNPq 402012/2010-0/GPPG-HCPA 10-560) e Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - PMDC (Programa de Ação de Extensão UFRGS 20274), o que deverá proporcionar dados mais representativos a médio prazo.

Apêndice I-Metodologia

Casuística

Estudo retrospectivo e prospectivo com pesquisa de fontes primárias e pesquisa de mecanismos genéticos básicos (Resolução CNS 340/04). Foram incluídas informações de amostras de indivíduos que realizaram investigação citogenética molecular no período de 1998 a 2012 com hipótese diagnóstica de microdeleção cromossômica. Esse trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Critérios de inclusão

1. Disponibilidade de amostra de indicação clínica compatível com síndrome de Microdeleção
2. Disponibilidade de amostra de indivíduo com suspeita citogenética de microdeleção.
3. Presença de informações mínimas sobre dados clínicos e investigação citogenética prévia disponível em banco de dados do laboratório ou em prontuários.

Critérios de exclusão

1. Amostras que não possuíam a quantidade e qualidade de material biológica mínima necessária para a aplicação dos métodos laboratoriais.
2. Amostras com indicação clínica de investigação de mais de uma síndrome de microdeleção.

3. Amostras com indicação para investigação citogenética molecular sem indicação clínica específica.

Tamanho amostral

A amostra foi de conveniência, não tendo sido realizado cálculo de tamanho amostral.

Coleta de dados

Esse estudo foi realizado com base no banco de dados do Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os resultados dos exames de cariótipos foram obtidos através da consulta ao arquivo de registro de exames do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica/HCPA. As informações clínicas mais relevantes relativas aos indivíduos foram posteriormente obtidas através de consulta ao prontuário hospitalar, que contém dados da história clínica e dos exames realizados (especialmente até o diagnóstico). Para garantir a uniformidade da coleta de dados, em determinados quadros clínicos associados a microdeleções estudadas nesse trabalho, foi utilizado um formulário específico (Anexo II, III e IV), o qual foi preenchido pela pesquisadora. Os dados foram coletados e registrados no período de março de 2011 à dezembro de 2012.

Métodos

Para a identificação e caracterização de todas as microdeleções foi utilizado o método de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH), modificado de Rautenstraub BW & Liehr T (2002). Para a definição dos pontos de quebra cromossômica, além do FISH, foi realizada investigação por *array*-CGH em amostras de microdeleção

selecionadas. O método de *array*-CGH foi realizado de acordo com instruções do fabricante. A plataforma usada nessas investigações foi a *Human Genome CGH Microarray 60K* (produzida pela Agilent Technologies, contendo cerca de 60.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano).

Para análise do experimento por FISH foi utilizado um microscópio de fluorescência (Olympus BX51) equipado com uma câmera de captura e registro de imagem XD500 3CCD (Olympus Corporation). Foram analisadas pelo método de FISH no mínimo 30 células metafásicas e/ou interfásicas, de acordo com o material disponível e com o protocolo interno do Laboratório de Citogenética Molecular para análise de microdeleções (POP/HCPA, M. Riegel 2011). As alterações cromossômicas detectadas foram classificadas de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (ISCN, 2013).

Apêndice II- Aspectos éticos

Nesse estudo foram respeitados os preceitos da Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. A coleta direta de informações sobre as amostras a serem investigadas nesse estudo foi feita após a aprovação pelo Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. A utilização do material biológico para esse estudo e informações associadas foi realizada de acordo com a Resolução Normativa Institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Fernandes e col., 2010).

As amostras selecionadas e as informações associadas foram provenientes de atividades de assistência e em alguns casos de biorrepositório de instituição externa. O processo de consentimento e armazenamento em Biorrepositório seguiu as rotinas estabelecidas para cada procedimento realizado pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Essa pesquisa envolveu a investigação de mecanismos genéticos básicos (estudos sobre localização, estrutura, função e expressão de genes humanos e da organização cromossômica) e ofereceu alta possibilidade de gerar conhecimento sobre a condição que afeta os sujeitos da pesquisa e de outros indivíduos afetados pela mesma condição. Entretanto, mesmo que os dados obtidos através desse estudo possam ser considerados relevantes, não trarão benefício direto de tratamento ao indivíduo.

Anexo 2 - Formulário dados clínicos síndrome de Wolf-Hirschhorn.



**DADOS CLÍNICOS
WOLF-HIRSCHHORN**

Rede Brasileira de Referência e Informação em Síndromes de Microdeleção
Centro Coordenador: Serviço de Genética Médica - HCPA - Porto Alegre - RS

Nome do paciente: _____ DN: ____ / ____ / ____
 Código RedeBrim: _____

• **Sexo:** Masculino Feminino Ignorado

• **Ao nascimento:** IG: _____ (sem) Peso: _____ (g) Comp.: _____ (cm) PC: _____ (cm)
 Idade materna: _____
 Idade paterna: _____

• **Ao exame físico:** Peso: _____ Altura: _____ PC: _____

	SIM	NÃO	DESC.		SIM	NÃO	DESC.
Gerais:				Dismorfias:			
Retardo do crescimento pré-natal (peso médio = 2000g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pés e mãos pequenos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Microcefalia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dedos estreitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Convulsões	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Artelhos em martelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Retardo mental profundo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	hipotrofia das regiões tenar e hipotenar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prognóstico reservado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	dermatoglyphos anormais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Padrão dismórfico:				Radiologia:			
Implantação do cabelo na fronte é alta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pelve estreita	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipertelorismo ocular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anomalias costo-vertebrais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ptose das pálpebras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Sinostose radio-ulnar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nariz afinado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Atraso da maturação óssea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Columela hipoplásica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pseudo-epífises	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lábio superior curto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Malformações:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Comissuras labiais desviadas para baixo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Intestinais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Região mentoniana pequena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Uterina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Malformações:				Disgenesia gonadal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cardiovasculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Extrofia de bexiga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cerebrais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ectrodactilia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Renais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Achados ocasionais: _____			
Coloboma da íris	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____			
Palato fendido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____			
Hipopédia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____			

Anexo 3- Formulário de dados clínicos - Síndrome de Prader-Willi



DADOS CLÍNICOS
SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Rede Brasileira de Referência e Informação em Síndromes de Microdeleção
Centro Coordenador: Serviço de Genética Médica - HCPA - Porto Alegre - RS

Nome do paciente: _____ DN: ____ / ____ / ____
 Código RedeBrim: _____

• **Sexo:** Masculino Feminino Ignorado

• **Ao nascimento:** IG: _____ (sem) Peso: _____ (g) Comp.: _____ (cm) PC: _____ (cm) Idade materna: _____ Idade paterna: _____

• **Ao exame físico:** Peso: _____ Altura: _____ PC: _____ Comp mão: _____ Comp pé: _____

	SIM	NÃO	DESCONHEÇO
Movimentos fetais reduzidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipotonia neonatal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alimentação por gavagem	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperfagia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Face típica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cabelos claros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cicatrizes por coçar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Indiferença à dor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estrabismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipotonia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Retardo mental/ motor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fronte estreita	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Redemoinho Frontal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pregas epicânticas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fendas palpebrais oblíquas ↗	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fendas palpebrais oblíquas ↘	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipogentalismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Criptorquidia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Escroto hipoplásico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estrias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Genu valgo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sentou a idade de _____			
Primeiros passos _____			

Anexo 4 - Formulário de dados clínicos - Síndrome de Angelman



DADOS CLÍNICOS
SÍNDROME DE ANGELMAN

Rede Brasileira de Referência e Informação em Síndromes de Microdeleção
Centro Coordenador: Serviço de Genética Médica - HCPA - Porto Alegre - RS

Nome do paciente: _____ DN: ____ / ____ / ____
 Código RedeBrim: _____

• **Sexo:** Masculino Feminino Ignorado

• **Ao nascimento:** IG: _____ (sem)
 Peso: _____ (g)
 Comp.: _____ (cm)

• **Ao exame físico:** Peso: _____
 Altura: _____
 PC: _____

	SIM	NÃO	DESCONHEÇO
Atraso global do desenvolvimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausência de fala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atraso da fala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Risadas sem motivos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marcha atáxica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ataxia de tronco ou extremidades	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperreflexia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anda sozinho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Microcefalia (<p3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Braquicefalia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dificuldades de deglutição	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Macrostomia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prognatismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mandíbula alargada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crises convulsivas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EEG anormal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperatividade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cabelos claros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anexo 5- Formulário de dados clínicos - Síndrome de Williams-Beuren



DADOS CLÍNICOS
SÍNDROME DE WILLIAMS

Rede Brasileira de Referência e Informação em Síndromes de Microdeleção
Centro Coordenador: Serviço de Genética Médica - HCPA - Porto Alegre - RS

Nome do paciente: _____ DN: ____ / ____ / ____
 Código RedeBrim: _____

• **Sexo:** Masculino Feminino Ignorado

• **Ao nascimento:** IG: _____ (sem) Peso: _____ (g) Comp.: _____ (cm) PC: _____ (cm)
 Idade materna: _____
 Idade paterna: _____

• **Ao exame físico:** Peso: _____ Altura: _____ PC: _____

	SIM	NÃO	DESCONHEÇO
Hipercoleemia na infância	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Defeitos cardiovasculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Se sim, descrever: _____			
Anomalias dentárias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Se sim, descrever: _____			
Bolsas periorbitais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ponte nasal achatada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bochechas cheias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lábios grossos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boca grande	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Voz rouca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Clinodactilia (mão/pé)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hipoplasia ungueal (mão/pé)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Malformação renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Se sim, descrever: _____			
Hiperatividade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alta sociabilidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ansiedade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Loquacidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anexo 6 - Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

**Termo de Compromisso para Utilização de
Material Biológico e Informações Associadas**

Título do Projeto

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CITOMOLECULAR DE
- MICRODELEÇÕES CROMOSSÔMICAS

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 17 de maio de 2011.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Natália Barcellos	
Mariluce Riegel	
Roberto Giugliani	

Anexo 7 - Autorização para utilização de material biológico de biorrepositório externo



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA**
Instituto de Biologia- Dep. Biologia Geral
Programa Genética & Sociedade



Salvador, 25 de janeiro de 2013

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizo a utilização de material biológico para o estudo “IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CITOMOLECULAR DE MICRODELEÇÕES CROMOSSOMICAS” sob a responsabilidade da Dra. Mariluce Riegel, desde que seja garantido o cumprimento das normas operacionais do Programa Genética & Sociedade e a utilização do material biológico de forma anônima e sem identificação.

Prof.ª Lília Maria de Azevedo Moreira
lazevedo@ufba.br
Coordenadora do Programa Genética & Sociedade
Departamento de Biologia, Instituto de Biologia
Universidade Federal da Bahia