

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**PESQUISA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS  
ASSOCIADOS ÀS MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS POR  
ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS BASEADA EM MICROARRANJOS**

**LUIZA EMY DORFMAN**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DRA MARILUCE RIEGEL**

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Nr. 401012/2010-0

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente agradeço aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional em todos os momentos, sem o qual não seria possível a realização deste mestrado.

À minha orientadora, Dra. Mariluce Riegel, que confiou em meu trabalho, me proporcionando a realização do sonho de fazer o mestrado na área que amo, e sob a sua orientação, uma profissional que sempre admirei e com a qual sempre quis trabalhar. Não tenho palavras para agradecer por tudo o que apreendi durante estes dois anos, esta experiência foi fundamental tanto para o meu amadurecimento profissional, quanto pessoal.

Ao Dr. Julio César Leite, coordenador do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PMDC/HCPA) pela colaboração e autorização do uso do material biológico para este estudo.

Ao Prof. Roberto Giugliani, chefe do Serviço de Genética Médica (SGM), por incentivar o meu retorno para o SGM e por sempre estar, de alguma forma, presente em minha caminhada profissional.

Às residentes Vanessa e Elenara que me auxiliaram a compreender os dados de registro do PMDC/HCPA.

Às queridas colegas/amigas do Laboratório de Citogenética do HCPA: Káren, Nathália, Thaís, Mariana e Bruna; pela compreensão com esta mestranda, pelo apoio e torcida sempre. Foi um imenso prazer ter a companhia de vocês durante este tempo e poder trocar experiências citogenéticas.

À querida Dra. Maria Teresa Sanseverino que há muito tempo já me incentivava a fazer mestrado, e por sua disponibilidade sempre em ajudar.

À Dra. Têmis Félix por auxiliar em minhas dúvidas clínicas e por me permitir cursar a sua disciplina, a qual foi fundamental para alguns aspectos deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica que me acolheram. Foi ótimo poder conviver novamente com antigos colegas, além de conhecer pessoas que também amam trabalhar com a genética.

À querida Marisa Campio Müller pelos seus ouvidos, conselhos e apoio no momento em que mais precisei.

Aos queridos amigos: Karlla, Adri, André, Tássia, Eduardo e Gabriel, companheiros de todas as horas, pelo apoio emocional e intelectual.

Ao PPGBM, em especial ao Elmo que sempre me auxiliou em tudo que precisei.

Ao Joel pela sua paciência, compreensão e carinho sempre.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	6
<b>Resumo</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	9
<b>Capítulo 1- Introdução</b> .....	10
1.1. Defeitos congênitos.....	11
1.1.1. Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas.....	13
1.2. Rearranjos cromossômicos e anomalias congênitas em recém-nascidos.....	14
1.3. O estudo dos cromossomos em humanos .....	16
1.3.1. Análise cromossômica clássica e molecular.....	17
1.3.2. Hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos.....	18
1.4. Variação do número de cópias de DNA no genoma humano.....	20
1.5. Interpretação de desequilíbrios genômicos identificados por <i>array-CGH</i> .....	21
<b>Capítulo 2 – Justificativa e Objetivos</b> .....	24
2.1. Justificativa.....	25
2.2. Objetivo Geral.....	26
2.3. Objetivos específicos.....	26
<b>Capítulo 3- Microarray-based Comparative Genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances and considerations about their clinical significance.</b> .....	27
<b>Capítulo 4 - Caracterização citogenômica dos rearranjos cromossômicos identificados por <i>array-CGH</i></b> .....	51
<b>Capítulo 5 – Discussão</b> .....	61
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	70
<b>Anexos</b> .....	77
Anexo 1 - Ficha de Registro Clínico do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do HCPA .....	78

Anexo 2 - Autorização do coordenador do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do HCPA para utilização de material biológico.....	79
Anexo 3 - Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico.....	80
Anexo 4 - Resumo das indicações clínicas associadas às 35 amostras incluídas no estudo no período referido para análise cromossômica convencional.....	81
Anexo 5 – Glossário.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

array-CGH –Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos

BACs – Cromossomos artificiais de bactéria

CGH – Hibridização Genômica Comparativa

CID – Classificação Internacional de doenças

CNPs – Polimorfismo do número de cópias (*Copy number polymorphisms*)

CNVs- Variação do número de cópias (*Copy number variations*)

del – Deleção

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNV – Declaração de Nascido Vivo

dup - Duplicação

ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas

FISH- Hibridização *in situ* por Fluorescência

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

kb - Quilobase

LCR- Baixo número de cópias (*low copy repeats*)

Mb- Megabase

MLPA – ( do ingles *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

p - braço curto

q – braço longo

PCR – Reação em cadeia da polymerase (*Polymerase chain reaction*)

PMDC – Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos

pb – Pares de base

NAHR – Recombinação homóloga não alélica (*non-allelic homologous recombination*)

NHEJ – Junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*)

RN – Recém-nascido

SKY – Carótipo espectral

SIM - Sistema de Informação sobre Mortalidade

SINASC - Sistema de Informações de Nascidos Vivos

SNP - polimorfismo de base única (*Single nucleotide polymorphism*)

VOUS – Variação de significado incerto (*Variants of unknown significance*)

YACs – Cromossomos artificiais de levedura

## RESUMO

---

Malformações congênitas ocorrem em aproximadamente 2% a 3% dos nascidos vivos, podendo compreender desde malformações discretas até graves defeitos que comprometem a sobrevivência. Estima-se que cerca de 6% dos casos de defeitos congênitos ocorram devido à presença de anomalias cromossômicas. Essa prevalência é, provavelmente, subestimada, uma vez que malformações mais graves podem levar a perdas fetais antes que um diagnóstico seja possível e, algumas vezes, as alterações cromossômicas ou desequilíbrios genômicos associados às malformações congênitas não são identificados. Este estudo teve como objetivo geral identificar rearranjos cromossômicos e variação do número de cópias (CNVs) do genoma por meio da investigação de microdeleções e microduplicações em recém-nascidos com malformações congênitas de etiologia desconhecida. Este trabalho fez parte de um projeto de desenvolvimento tecnológico para o estabelecimento do método de análise comparativa de genomas em um hospital universitário público. Foi realizado um estudo retrospectivo em 35 amostras de DNA estocadas em biorrepositório por meio da análise total do genoma pela técnica de Hibridação Genômica Comparativa baseada em microarranjos (*array-CGH*). Todas as CNVs detectadas foram comparadas com as descritas em bancos públicos de dados genômicos, e sua significância clínica foi estimada. Treze alterações genômicas foram detectadas em 12/35 (34,3 %) das amostras. Em 4/35 (11,4%) dessas, os desequilíbrios genômicos puderam ser definidos como patogênicos e causalmente relacionados às anomalias congênitas; em 5/35 (14,3%) das amostras, CNVs de significado clínico incerto foram identificadas; e, em 4/35 (11,4%), variantes normais foram detectadas. Entre os 4 casos cujos resultados foram considerados causalmente relacionados com os achados clínicos, 2/4 (50%) tinham alterações patogênicas que estão reconhecidamente associados à síndromes de microdeleção definidas. Em 2/4 amostras (50%), os desequilíbrios cromossômicos encontrados, ainda que preditos como patogênicos, não haviam sido previamente associados à entidades clínicas reconhecidas. O uso de *array-CGH* indicou a presença na amostra estudada de rearranjos cromossômicos não identificados previamente, permitindo a identificação de regiões cromossômicas relacionadas à algumas anomalias congênitas. Além disso, ainda que a interpretação dos resultados deva ser refinada, os dados sugerem que a análise comparativa de genomas por *array-CGH* seja considerada como investigação de primeira linha no rastreamento seletivo para análise prospectiva/retrospectiva de amostras de DNA em programas de monitoramento de defeitos congênitos.

## ABSTRACT

---

Congenital malformations occur in approximately 2% to 3% of live births and may comprise from mild to severe malformations defects that compromise survival. It is estimated that about 6% of the cases of birth defects occur due to the presence of chromosomal abnormalities. This prevalence is probably underestimated, since more severe malformations may lead to fetal loss before a diagnosis is possible, and sometimes, the chromosomal aberrations or genomic imbalances associated with congenital malformations are not identified. This study had as main objective to identify chromosomal rearrangements and copy number variations (CNVs) in the genome through the investigation of microdeletions and microduplications in newborns with congenital malformations of unknown etiology. This work was part of a technological development project for the establishment of the method of comparative analysis of genomes in a public university hospital. A retrospective study was performed on 35 DNA samples stored in a biorepository through whole-genome based microarrays Comparative Genomic Hybridization (array-CGH). All CNVs detected were compared with those described in public genome databases, and their clinical significance was estimated. Thirteen genomic alterations were detected in 12/35 (34.3%) of the samples. On 4/35 (11.4%) of these, the genomic imbalances were defined as pathogenic and causally related to congenital anomalies; in 5/35 (14.3%) samples CNVs of uncertain clinical significance were identified and in 4/35 (11.4%), normal variants were detected. Among the 4 cases whose results were considered causally related to clinical findings, 2/4 (50%) had pathogenic changes that are associated with well-known microdeletion syndromes. In 2/4 samples (50%), chromosomal imbalances found, although predicted as pathogenic, have not been previously associated with the recognized clinical entities. The use of array-CGH indicated the presence of chromosomal rearrangements not previously identified, allowing the identification of chromosomal regions related to some congenital anomalies. Moreover, although the interpretation of the results should be refined, the data suggest that comparative genome analysis by array-CGH must be considered as first-line investigation in selective screening for prospective/retrospective analysis of DNA samples in birth defects monitoring programs.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

## 1.1. Defeitos Congênitos

Anomalias congênitas (AC) ou defeitos congênitos são alterações morfológicas e/ou funcionais detectáveis ao nascimento. As alterações morfológicas ou anatômicas exibem manifestações clínicas muito diversificadas em órgãos ou segmentos corporais, desde dismorfias leves altamente prevalentes na população, até defeitos complexos e extremamente raros. Estes defeitos podem apresentar-se isolados ou associados, compondo síndromes de causa genética e/ou ambiental. As anomalias congênitas anatômicas são genericamente chamadas de malformações congênitas (MFC) (Manual de Anomalias Congênitas, 2012). As malformações congênitas fazem parte de uma vasta categoria de defeitos congênitos, juntamente com o retardo mental de origem pré-natal, os erros inatos do metabolismo e outros distúrbios de origem principalmente genética (ICBDMS, 2013; OMS, 2013).

De acordo com o relatório da *United Nations Children's Fund* (UNICEF) de 2013 (<http://www.childinfo.org/mortality.html>) desde 1990 a taxa de mortalidade global em crianças abaixo de 5 anos caiu 47% - de 90 mortes a cada 1000 nascidos vivos em 1990, para 48 em 2012. Todas as regiões do mundo, exceto a África sub-sahariana e a Oceânia, reduziram suas taxas de mortalidade abaixo de 5 anos em 50% ou mais. No Brasil, a mortalidade neonatal (entre 0 e 27 dias de vida) representa cerca de 60 a 70% da mortalidade infantil (Ministério da Saúde, 2011). No mundo, a taxa de mortalidade neonatal teve um declínio mais lento, de 37% - menos do que o declínio de 47% da taxa de mortalidade em crianças menores de cinco anos. A taxa de mortalidade infantil no Brasil, calculada em crianças menores de um ano, em 1990 era de 49% enquanto que em 2011 foi reduzida para 14% (<http://www.unicef.org>, 2013).

Esse fato evidencia as mudanças econômicas do país refletindo nos indicadores da condição de vida e saúde da população. Embora tenha ocorrido um decréscimo significativo de mortalidade infantil e perinatal, a taxa de mortalidade infantil em decorrência de anomalias congênitas, tem se mantido constante nas últimas décadas (Victora *et al.*, 2011). A taxa de mortalidade infantil por malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas, que ocupava a quinta colocação em frequência na década de 80, assumiu a segunda posição no ano 2000 (<http://www.datasus.gov.br>, 2013). As anomalias congênitas foram responsáveis por 4% das mortes em crianças abaixo de 5 anos de idade no mundo todo, já na faixa etária

neonatal, as anomalias congênitas representaram 9% das causas de mortalidade (<http://www.childinfo.org/mortality.html>).

Nazer & Cifuentes (2011) realizaram um levantamento do período de 1995 a 2008, baseado nos dados do Estudo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), com informações de nascimentos de 9 países da América Latina. Dados gerais do ECLAMC apresentaram uma taxa global de 2,7% de malformações, ocorrendo em 2,6% nos nativos, e 8,6% dos natimortos. O Brasil teve uma taxa global de 4,2% de malformações, sendo de 4,0% em nativos e de 14,8% em natimortos. O estudo em questão apresentou uma grande heterogeneidade nas taxas de prevalência de malformações congênitas entre os países analisados. Segundo os autores, essas diferenças podem ter ocorrido devido a fatores genéticos, ambientais, étnicos ou idade materna, sem desconsiderar vieses analíticos.

No que se refere à incidência de MFC, há controvérsias quanto aos dados estatísticos brasileiros. Os estudos não consideram grupos multiétnicos na obtenção dos resultados, dificultando a compreensão da incidência tanto nas diferentes regiões, quanto no país como um todo (Pereira *et al.*, 2008; Horovitz *et al.*, 2013). No Brasil, estudos de morbidade em crianças indicam que as enfermidades genéticas e os defeitos congênitos representam 37% das internações pediátricas em centros terciários de assistência à saúde (Horovitz *et al.*, 2005) e são responsáveis por altas taxas de cesarianas e prematuridade (Guerra *et al.*, 2008).

As MFC menores são relativamente frequentes na população geral e não acarretam problemas significativos aos portadores. A associação de duas ou mais anomalias menores ocorre em alta frequência nas síndromes malformativas. As MFC maiores, são as que trazem consequência clínica e/ou estética ao portador. Cerca de 2% dos recém-nascidos apresentam este tipo de anomalia, sendo que 1% têm malformações múltiplas. Às vezes, exigem investigação rigorosa, caso das hipospádias proximais que potencialmente devem ser encaradas como problemas de intersexo. Estas malformações deixam sequelas funcionais importantes e frequentemente são de elevada morbimortalidade (Manual de Anomalias Congênitas, 2012). Em 2010, foram registrados como portadores de MFC 0,8% dos nativos, sendo que as três MFCs mais frequentes foram as relacionadas ao aparelho osteomuscular (43,0%), do sistema nervoso (11,3%) e dos órgãos genitais (9,8%) (Ministério da Saúde, 2011). A identificação precoce da natureza genética de uma determinada condição pode auxiliar

no tratamento, e ajudar a identificar os recursos para fornecer os melhores cuidados para a saúde desses indivíduos.

### **1.1.1 Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas (PMDC/ECLAMC)**

O programa considerado “padrão-ouro” para a detecção de defeitos congênitos na América do Sul é o programa de base hospitalar do Estudo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), que funciona ininterruptamente desde 1967 (Castilla & Orioli, 2004). O ECLAMC é formado por uma rede de profissionais interessados na pesquisa e prevenção de defeitos de congênitos (Poletta *et al.*, 2014). O ECLAMC está vinculado à “*International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research*” (ICBDSR), uma Organização não Governamental ligada à Organização Mundial de Saúde que recolhe informações dos programas de vigilância e pesquisa de anomalias congênitas em âmbito mundial. Através dos registros de nascimentos em maternidades de 10 países da América do Sul o ECLAMC examina cerca de 200.000 nascimentos consecutivos (500 g ou mais) por ano. Todas as anomalias maiores e menores observadas ao nascimento são registradas de acordo com os conceitos predefinidos em seu manual operacional (ECLAMC: Manual Operacional 2007).

Até o ano de 2008, o ECLAMC possuía o registro de mais de 5 milhões de nascimentos, com mais de 300.000 casos de recém-nascidos com malformações congênitas e seus controles (Nazer & Cifuentes, 2011). As informações coletadas e registradas compreendem 80 variáveis relacionadas à fatores de risco genéticos e ambientais. A complexidade dessas informações varia desde as muito elementares, tais como gênero ou peso ao nascimento, até as mais complexas, como a exposição gestacional a fatores de risco para malformações, e informações cruzadas como histórico familiar, ancestralidade e consanguinidade.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) passou a integrar o ECLAMC a partir de 1983, primeiramente na modalidade coorte e a partir de 1986 na modalidade caso-controle. O Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos (PMDC) do HCPA segue as normas operacionais do ECLAMC, inclusive na definição de quais anomalias devem ser registradas. O objetivo principal do PDMC/ECLAMC é monitorar

os nascimentos ocorridos no HCPA, por meio de um estudo caso-controle, para observar o comportamento das frequências de alguns efeitos congênitos e associar os dados a possíveis fatores de risco (Leite *et al.*, 2001). Todo este esforço contribui para indicar possíveis medidas preventivas com o intuito de diminuir a prevalência destas malformações e, se possível, detectar algum fator ambiental ainda desconhecido que possa estar influenciando no desenvolvimento dos fetos. O PMDC, ao manter um registro ininterrupto dos nascimentos no HCPA, disponibiliza um valioso banco de dados para o desenvolvimento de estudos sobre defeitos congênitos (Leite *et al.*, 2001).

## **1.2. Rearranjos cromossômicos e anomalias congênitas em recém-nascidos**

Apesar de individualmente raras, a soma das prevalências das anomalias cromossômicas e das doenças multifatoriais torna as doenças genéticas relativamente frequentes em seu conjunto (Schinzel, 2001). Tem sido referido que a etiologia dos defeitos congênitos seja em 6% dos casos causada por anomalias cromossômicas; em 7,5% monogênica; em 20% multifatorial; e 6 a 7% causada por fatores ambientais, incluindo teratógenos, infecções e doenças maternas (Caluseriu & Reardon, 2012). A etiologia de mais de 50% dos defeitos congênitos ainda é desconhecida, e por serem patologias individualmente pouco frequentes, entre outros fatores, são difíceis de investigar (Calvo *et al.*, 2012).

Estudos clássicos em citogenética observaram que as anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais estão presentes em cerca de 1% das amostras não selecionadas de recém-nascidos (Jacobs *et al.*, 1992) e em mais de 10% dos natimortos (Jackson, 2002). A partir destes, vários trabalhos utilizando métodos de citogenética convencional foram publicados com uma frequência semelhante, mas que varia de acordo com a metodologia utilizada para detectar estas alterações. Estima-se que, aproximadamente, 10 a 15% das crianças nascidas com malformações congênitas, incluindo nativos e natimortos, apresentem desequilíbrios cromossômicos (Nelson & Holmes, 1989; Le Caignec *et al.*, 2005; Korteweg *et al.*, 2008). Destes, cerca de 80% são trissomias dos cromossomos 13, 18 ou 21. As alterações cromossômicas mais frequentes são as numéricas, e em cerca de 40% dos casos ocorrem alterações estruturais do genoma (Jackson *et al.*, 2002).

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias para a detecção de alterações no DNA, o número de desequilíbrios genômicos identificados tem crescido rapidamente e várias doenças genômicas e síndromes malformativas tem sido descritas nos últimos anos (Vissers & Stankiewicz, 2012). Variantes estruturais (SVs) levando a desequilíbrios de dosagem gênica no genoma têm sido observados em até 20% de recém-nascidos com MFC e atraso de desenvolvimento.

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 *et al*, 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.

Foram propostos três mecanismos principais para explicar a 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 & 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.

Lu *et al.* (2008) relataram a frequência de desequilíbrios genômicos em 638 neonatos com diversos defeitos congênitos variados referidos para análise cromossômica por *microarrays*. No conjunto, 17.1% dos pacientes foram identificados com desequilíbrios clinicamente significantes, com taxa de detecção de 13,7%, 16,6% e 19,9%, dependendo da resolução da plataforma de *arrays* utilizada. Aproximadamente em 28.6% dos recém-nascidos (RNs) com anomalias congênitas múltiplas e cardiopatias congênitas ou 27.1% daqueles com anomalias congênitas e dismorfismos foram detectadas CNVs. As regiões cromossômicas mais frequentemente alteradas foram a

22q11.2 (região crítica da síndrome de deleção 22q11.2 OMIM # 188400/ #192430), 5p15.4 e 4p16.3. Reddy *et al.* (2012) relataram os resultados de um estudo populacional em 532 natimortos. Nessas amostras, a análise por *array-CGH* evidenciou mais alterações do que a análise pelo cariótipo (87,4% vs 70,5%), permitiu detecção mais precisa das alterações genéticas (aneuploidias ou CNVs patogênicas, 8,3% vs 5,8%) e também permitiu identificar um maior número de desequilíbrios genômicos entre os 67 natimortos com anomalias congênicas (29,9% vs 19,4%).

Até o momento, o estudo mais abrangente de triagem neonatal (realizado em 20.126 casos não selecionados) com a utilização de análise por *array-CGH* como teste de primeira linha revelou que 87/20.126 (0,43%) dos recém-nascidos apresentavam desequilíbrios cromossômicos (53 casos de aneuploidias, 23 de deleções e 11 de duplicações) (Park *et al.*, 2013).

### **1.3. O estudo dos cromossomos em humanos**

O mapeamento genético é frequentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlações entre alterações cromossômicas ou genômicas associadas aos fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias que apresentam vários indivíduos afetados. Na primeira abordagem, a presença de alterações associadas à fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra, a monossomia ou a duplicação de segmentos, possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a condição observada. As técnicas citogenéticas clássicas utilizadas para o estudo de cromossomos incluem bandamento cromossômico, com uma resolução limitada em várias situações, e que não permite relacionar de forma acurada o genótipo com uma condição clínica. Por esse motivo, ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos métodos com uma maior resolução de detectar desequilíbrios genômicos utilizando instrumentos de biologia molecular aplicados à citogenética (citogenética molecular). A aplicação de métodos de citogenética molecular permite uma análise mais detalhada dos cromossomos e de sua arquitetura genômica possibilitando, por meio da análise citogenômica, a cada vez mais, a identificação e caracterização de desequilíbrios genômicos associados às doenças em humanos.

### **1.3.1 Análise cromossômica clássica e molecular**

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 anomalias cromossômicas numéricas e estruturais que tenham pelo menos de 3 a 10 milhões de pares de base de DNA (4Mb a 10Mb). Essa medida corresponde ao poder de resolução do método em detectar uma banda cromossômica. O 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. As bases moleculares de bandamento envolvem a composição de bases (nucleotídeos), proteínas e a organização funcional do genoma.

O nível de resolução de uma técnica citogenética é determinado pelo número de bandas visíveis. Com as técnicas de bandas e de maior resolução (800 a 2.000 bandas), tornou-se possível identificar algumas anormalidades cromossômicas estruturais associadas à fenótipos característicos e resultantes de desequilíbrio de dosagem de segmentos cromossômicos específicos. Em situações especiais pode-se indicar o bandamento de alta resolução, em que são analisados os cromossomos durante a prófase ou prometáfase.

A análise cromossômica por bandamento permanece como um dos exames genéticos mais comuns e acessíveis realizados para diagnóstico, tanto na área de pediatria e oncologia quanto na de obstetrícia/ginecologia. Esse método, porém, apresenta várias limitações. As técnicas de citogenética clássica, baseadas em bandamentos cromossômicos, permitem o diagnóstico de alterações cromossômicas estruturais com a identificação de deleções, inversões, inserções, translocações e outros rearranjos cromossômicos. No entanto, muitas aberrações estruturais, como pequenas deleções e duplicações menores do que 3-5 Mb, cromossomos marcadores e rearranjos cromossômicos complexos, não são possíveis de serem identificadas ou bem caracterizadas. Além disso, os procedimentos citogenéticos clássicos necessitam de cultivo celular para a obtenção de cromossomos em metáfase e estão limitados a certas células e tecidos.

No final da década de 80, o estudo de cromossomos em humanos foi muito beneficiado pelo desenvolvimento de métodos não isotópicos de hibridação *in situ* que permitiu a detecção de alterações submicroscópicas. O método mais comum é a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). No método de FISH, uma variedade de tipos de sondas é usada para investigar cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos específicos. A introdução de técnicas citogenéticas moleculares trouxe um grande avanço na detecção e identificação de rearranjos cromossômicos e elucidou as bases citogenéticas de síndromes conhecidas. Deste modo, foi possível uma melhor caracterização de aberrações cromossômicas previamente descritas, particularmente cromossomos marcadores extras e duplicações *de novo*, as quais não podiam ser caracterizadas com os métodos de bandamento citogenético convencionais (rev. Maluf & Riegel, 2011).

A otimização do método de hibridação *in situ* resultou no desenvolvimento de diferentes técnicas baseadas no princípio da hibridação *in situ* fluorescente, entre eles o cariótipo espectral (SKY) (Liyanage *et al.*, 1996) e multicolor FISH (m-FISH) (Uhrig *et al.*, 1999). Nesses métodos a combinação de fluorocromos permite identificar cada um dos 23 pares de cromossomos. Outro método baseado nesse mesmo princípio é a hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization – CGH*), que foi desenvolvida como método de rastreamento genômico amplo, inicialmente na tentativa de se identificar desequilíbrios no número de cópias do DNA em células tumorais (rev. Riegel, 2014).

### **1.3.2 Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos**

Desenvolvida inicialmente em 1992, a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (*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 *et al.*, 1992). Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e utilizando a tecnologia de microarranjos (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 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 fixado, 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.

As sondas-alvo de *arrays* são segmentos de DNA conhecidos e clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BACs – *Bacterial Artificial Chromosomes*) (Telenius *et al.*, 1992), (de tamanho de 75-200 kb) ou menores inseridos em cosmídeos (30-40 kb), fosmídeos (40-50 Kb) ou plasmídeos (2-6 Kb). Podem também ser sintetizados, como no caso de oligonucleotídeos. Os primeiros *arrays* foram construídos com plataformas de cosmídeos (Solinas-Toldo *et al.*, 1997), substituídos em seguida por BACs (Pinkel *et al.*, 1998). Devido ao grande tamanho das sondas, esses *arrays* possuem alta sensibilidade e os resultados podem ser confirmados por FISH. 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 & Pinkel, 2003) e SNPs (*Single nucleotide polymorphism*) têm possibilitado uma cobertura com maior resolução e abrangência do genoma humano (Shaikh, 2007).

As principais vantagens da técnica de *array-CGH*, se comparada com as técnicas de citogenética convencional e com outros métodos de citogenética molecular, são: **1.** Não ser 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 uma única análise, em um curto período de tempo e com alta resolução e, **3.** A sensibilidade e a especificidade do método são bastante altas.

Embora o *array-CGH* tenha provado ser uma técnica eficiente e reproduzível para o estudo de rearranjos cromossômicos, evidenciam-se algumas desvantagens quando comparada com as técnicas citogenéticas: **1.** Impossibilidade de detectar rearranjos equilibrados (translocações, inserções e inversões); **2.** Impossibilidade de determinar a ploidia do genoma investigado, não sendo possível diferenciar uma poliploidia de um cariótipo normal; **3.** Dificuldade em determinar a origem estrutural de uma aberração e, **4.** Níveis de mosaicismos abaixo de 30% podem ser difíceis de detectar. Estas limitações dependem do princípio geral da metodologia, enquanto que o desempenho de um experimento utilizando *array-CGH* depende também do tipo de

plataforma a ser empregada. O tipo de DNA utilizado e a quantidade de regiões pesquisadas variam entre diferentes protocolos e distintas plataformas.

#### **1.4. Variação do número de cópias de DNA no genoma humano**

A variação do número de cópias (do inglês *Copy Number Variations* - CNVs) está relacionada com segmentos de DNA maior ou igual a 1 kb, cujo número de cópias em um dado indivíduo se mostra variável devido à perda ou ao ganho de material genético em comparação com um genoma de referência (Feuk *et al.*, 2006). Variações genômicas que perturbam a condição diplóide, como deleção, duplicação ou triplicação de material genômico, podem ter como consequência um fenótipo anormal. 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 *et al.*, 2004).

Tem sido demonstrado que genomas de indivíduos não aparentados diferem grandemente em relação ao número dessas CNVs. A dimensão dessa variabilidade se tornou evidente quando trabalhos independentes (Sebat *et al.*, 2004; Iafrate *et al.*, 2004; Tuzun *et al.*, 2005) demonstraram pelo uso de diferentes plataformas de *array-CGH* que genomas de indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam significativamente quanto ao número de cópias. Em média, dois indivíduos não relacionados podem diferir em até 12% do seu genoma devido à presença de CNVs (Redon *et al.*, 2006).

As CNVs podem ocorrer em parte das sequências 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 por meio da influência na alteração de funções fisiológicas. 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 a síndromes de genes contíguos (Lee *et al.*, 2007; Lee & Scherer, 2010).

A maioria das CNVs, em um genoma individual não são decorrentes de novas mutações, mas de polimorfismos do número de cópias (do inglês *copy number polymorphisms* ou CNPs) compartilhadas com várias outras pessoas (Mills *et al.*, 2011; Sebat *et al.*, 2004; Tuzun *et al.*, 2005). Os CNPs são frequentemente localizados próximos a outros tipos de rearranjos genômicos e muitos ocorrem dentro de regiões genômicas conhecidas de rearranjos recorrentes associados à síndromes, como Prader-Willi/Angelman, DiGeorge/Velocardiofacial e atrofia muscular espinhal. Esses CNPs não implicam diretamente na condição da doença, mas podem estar refletindo em uma instabilidade dessas regiões genômicas (Sebat *et al.*, 2004).

O maior desafio atual em relação à identificação de CNVs consiste em distinguir entre as que estão relacionadas à uma condição genética específica das que estão presentes na população em geral.

### **1.5. Interpretação de desequilíbrios genômicos identificados por *array-CGH***

O uso generalizado do método de *array-CGH* revelou que uma grande proporção do genoma humano contém regiões do número de cópias variável, e distinguir entre ganhos e perdas patogênicos e benignos têm sido um desafio. Embora a tecnologia de *microarrays* esteja bem estabelecida tecnicamente e existam inúmeros algoritmos disponíveis para a estimativa do número de cópias (McDonnell *et al.*, 2013), a resolução das plataformas de matriz utilizados na citogenética molecular e a compreensão dos efeitos clínicos de CNVs ainda estão em constante processo de avaliação. CNVs recorrentes podem ser detectados tanto em indivíduos afetados por uma doença quanto em indivíduos saudáveis. Frequentemente, mais de uma CNV é identificada em um portador podendo reduzir ou agravar o fenótipo clínico na presença de uma CNV patogênica. Girirajan, *et al.* (2010) demonstraram que a microdeleção 16p11.2 predispõe indivíduos a fenótipos neuropsiquiátricos quando é um evento único e agrava fenótipos do desenvolvimento neurológico quando em associação com outras grandes deleções ou duplicações no genoma de um mesmo indivíduo.

A grande quantidade de informações clínicas e citogenéticas disponíveis em bancos de dados de acesso livre poderia ajudar a decifrar as combinações de variantes que levam a diferentes graus de patogenicidade. Fatores que influenciam a patogenicidade de CNVs, e uma classificação baseada em evidências para a

interpretação clínica de CNVs, têm sido discutidos e propostos (Lee *et al.*, 2007; Hehir-Kwa *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Gijsbers *et al.*, 2011; de Leeuw *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2012; Liehr, 2014). Recursos on-line e bancos de dados públicos têm sido desenvolvidos e são utilizados pela comunidade científica e biomédica.

Embora estratégias comuns tenham sido propostas para ajudar a interpretar resultados de CNVs, ainda não existe um critério universal. A maior parte dos laboratórios classifica as CNVs em categorias diferentes utilizando algumas ou todas as classificações propostas. De uma maneira geral, a classificação estabelece 3 principais categorias: CNV benigna ou variante genômica normal; CNV com relevância clínica incerta ou variantes de significado indeterminado (*VOUS*) e CNV patogênica, com relevância clínica, ou possivelmente patogênica (Miller *et al.*, 2010, de Leuw *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2012). No entanto, a plataforma de *microarrays* utilizada e os critérios de informação podem variar entre diferentes laboratórios. Além dos bancos de dados públicos disponíveis, alguns laboratórios têm seus próprios bancos de dados de variantes, considerando que populações distintas podem ter variações distintas.

Ao interpretar e classificar CNVs, é essencial distinguir ganhos com perdas genômicas porque as potenciais consequências clínicas podem diferir significativamente (Vermeesch *et al.*, 2012). As características das bases de dados disponíveis na internet comumente utilizados e de recursos *on line* de uma maneira geral foram resumidos por de Leeuw *et al.*, (2012), que propuseram uma estratégia geral de interpretação que pode ser utilizada para a análise comparativa de genomas. Algumas das bases de dados de variantes na população e em indivíduos portadores de fenótipos associados a anormalidades cromossômicas, disponíveis *on-line* (dezembro de 2013), estão listadas a seguir:

*Centre for the Development and Evaluation of Complex Interventions for Public Health Improvement (DECIPHER) project:* <http://decipher.sanger.ac.uk>

*The Chromosome Anomaly Collection:* <http://www.ngrl.org.uk/wessex/collection/>

*Chromosomal Variation in Man Online Database:*  
<http://www.wiley.com/legacy/products/subject/life/borgaonkar/access.html>

*Cytogenetic Data Analysis System (CyDAS):* <http://www.cydias.org/>

*Database of genomic structural variation (bdVar):* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>

*Database of Genomic Variants (DGV):* <http://projects.tcag.ca/variation>

*Ensembl Genome Browser:* <http://www.ensembl.org/>

*European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA):* <http://www.ecaruc.net>

*The International Collaboration for Clinical Genomics:* <http://www.iccg.org/>

*Small supernumerary marker chromosomes:* <http://ssmc-tl.com/sSMC.html>

*University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC):* <http://genome.ucsc.edu/>

**CAPÍTULO 2**  
**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

## 2.1. Justificativa

A análise cromossômica convencional para a detecção de aneuploidias e de aneussomias segmentais através do cariótipo padrão com bandamento G, utilizada rotineiramente na investigação de neonatos com anomalias congênitas, permite o diagnóstico de alterações maiores que 3-5 Mb, apenas. Nas últimas décadas, técnicas moleculares como a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array-CGH*), permitiram um aumento da resolução das análises e a identificação de desequilíbrios genômicos menores. A detecção de microdeleções e microduplicações ao longo do genoma permite definir rearranjos cromossômicos e variações do número de cópias (CNVs). Dados da literatura indicam que os rearranjos cromossômicos e CNVs estão envolvidos numa parcela significativa das anomalias congênitas, de modo que estudos citogenômicos deverão trazer informações importantes para a compreensão da sua etiologia. A investigação por *array-CGH* permite que a pesquisa de alterações cromossômicas submicroscópicas seja feita a partir de amostras de DNA, o que é importante uma vez que nem sempre é possível obter células do paciente para estudos citogenéticos convencionais ou mesmo por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Além disso, estudos com FISH exigem uma indicação clínica específica (para utilização da sonda correta no teste), o que nem sempre é possível de se perceber num recém-nascido, os quais algumas vezes vão a óbito pouco após o nascimento. Assim, a investigação de neonatos com anomalias congênitas por *array-CGH* contribui para um diagnóstico acurado, o que é fundamental para o aconselhamento genético a ser prestado às famílias e que deve impactar favoravelmente o manejo global dos casos. Estudos sobre a frequência e o tipo de rearranjos cromossômicos submicroscópicos em neonatos com anomalias congênitas de causa não conhecida ainda são escassos no Brasil, e a exequibilidade e utilidade de estudos por *array-CGH* ainda está por ser demonstrada e justificada.

## 2.2. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral identificar rearranjos cromossômicos e variação do número de cópias (CNVs) do genoma por meio da investigação de microdeleções e microduplicações em recém-nascidos com malformações congênitas de etiologia desconhecida.

## 2.3. Objetivos Específicos

- Detectar desequilíbrios genômicos por meio de *array-CGH* associados à malformações congênitas de etiologia desconhecida.
- Caracterizar do ponto de vista citogenômico as regiões cromossômicas que apresentem número de cópias alterado
- Comparar as alterações encontradas com as de bancos públicos de dados genômicos e avaliar a sua significância clínica.
- Avaliar a viabilidade da utilização do método de *array-CGH* para análise comparativa de genomas em um hospital universitário do Sistema Único de Saúde.

### **CAPÍTULO 3**

**Microarray-based Comparative Genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances and considerations about their clinical significance**

---

*Artigo submetido, janeiro de 2014.*

A manuscript number has been assigned: JPED-D-14-00099



Posteingang x



**Jornal de Pediatria** [jped@jped.com.br](mailto:jped@jped.com.br) [über eesmail.elsevier.com](mailto:uber.eesmail.elsevier.com)  
an mich; mriegel

Ms. Ref. No.: JPED-D-14-00099

Title: Microarray-based Comparative Genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of about their clinical significance  
Jornal de Pediatria

Dear Dr. Mariluce Riegel,

Your submission "Microarray-based Comparative Genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies considerations about their clinical significance" has been assigned manuscript number JPED-D-14-00099.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jped/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Jornal de Pediatria.

Kind regards,

Cristine Henderson Severo  
Receiving Ed/Office  
Jornal de Pediatria

Title: Microarray-based Comparative Genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances and considerations about their clinical significance

Short title: Array CGH in neonates with congenital anomalies

Authors: Luiza Dorfman<sup>1</sup>, Júlio César L Leite MD, PhD<sup>2</sup>, Mariluce Riegel, PhD<sup>1,2</sup>

Authors e-mails, CV Lattes and contributions:

luiza\_dorfman@yahoo.com.br CV lattes: <http://lattes.cnpq.br/4775815681370527>  
(contribution: laboratory analyses, data interpretation, manuscript writing)

jcleite@hcpa.ufrgs.br CV lattes: <http://lattes.cnpq.br/8813711478067403>  
(contribution: clinical data collection, manuscript critical review)

mriegel@hcpa.ufrgs.br CV lattes: <http://lattes.cnpq.br/9723906062426963>  
(contribution: project design, laboratory analyses, data interpretation, manuscript writing, manuscript submission)

Conflicts of Interest: Authors have no conflict of interest to disclose

Affiliations:

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author and author in charge of pre-publication contact:

Mariluce Riegel

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil

Tel + 55 51 3359 8011; Fax + 55 51 3359 8010; E-mail [mriegel@hcpa.ufrgs.br](mailto:mriegel@hcpa.ufrgs.br)

Funding sources: CNPq/Brazil, grant 402012/2010-0

Main text word count: 2,998 words

Abstract word count: 488 words

Tables and Figures: 2 tables and 1 figure

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To identify chromosomal imbalances by whole-genome microarray-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) in DNA samples of neonates with congenital anomalies of unknown cause from a birth defects monitoring program at a public maternity hospital. **METHODS:** A blind genomic analysis was performed retrospectively in 35 stored DNA samples of neonates born between July/2011 and December/2012. All potential DNA copy number variations detected (CNVs) were matched with those reported in public genomic databases, and their clinical significance was evaluated. **RESULTS:** Out of a total of 35 samples tested, 13 genomic imbalances were detected in 12/35 cases (34.3%). In 4/35 cases (11.4%), chromosomal imbalances could be defined as pathogenic; in 5/35 (14.3%) cases, DNA CNVs of uncertain clinical significance were identified; and in 4/35 cases (11.4%), normal variants were detected. Among the 4 cases with results considered causally related to the clinical findings, 2/4 (50%) showed causative alterations already associated with well-defined microdeletion syndromes. In 2/4 samples (50%), the chromosomal imbalances found, although predicted as pathogenic, had not been previously associated with recognized clinical entities. **CONCLUSIONS:** Array-CGH analysis allowed for a higher rate of detection of chromosomal anomalies, and this determination is especially valuable in neonates with congenital anomalies of unknown etiology, or in cases in which karyotype results cannot be obtained. Moreover, although the interpretation of the results must be refined, this method is a robust and precise tool that can be used in the first-line investigation of congenital anomalies and should be considered for prospective/retrospective analyses of DNA samples by birth defects monitoring programs.

## RESUMO

**OBJETIVOS:** Este estudo identificou desequilíbrios cromossômicos por Hibridização Genômica Comparativa de genoma total baseada em microarranjos (*array-CGH*) em amostras de DNA de neonatos com malformações congênicas de causa desconhecida, de um programa de monitoramento de defeitos congênicos de uma maternidade hospitalar pública. **MÉTODOS:** Uma análise genômica cega foi realizada retrospectivamente em 35 amostras de DNA armazenadas, coletadas de neonatos nascidos entre julho/2011 e dezembro/2012. Todas as variações no número de cópias (CNVs) detectadas foram comparadas com as descritas em bancos públicos de dados genômicos, e sua significância clínica foi avaliada. **RESULTADOS:** Treze desequilíbrios genômicos foram detectados em 12/35 casos (34,3 %). Em 4/35 casos (11,4%), os desequilíbrios cromossômicos puderam ser definidos como patogênicos e causalmente relacionados aos fenótipos alterados; em 5/35 (14,3%) casos, CNVs de significado clínico incerto foram identificados; e, em 4/35 casos (11,4%), variantes normais foram detectadas. Entre os 4 casos cujos resultados foram considerados causalmente relacionados com os achados clínicos, 2/4 (50%) tinham alterações patogênicas que já haviam sido associadas com síndromes de microdeleção bem conhecidas. Em 2/4 amostras (50%), os desequilíbrios cromossômicos encontrados, ainda que preditos como patogênicos, não haviam sido previamente associados com entidades clínicas reconhecidas. **CONCLUSÕES:** Análise do genoma total por *array-CGH* permitiu uma taxa mais alta de detecção de anomalias cromossômicas, em comparação com a análise cromossômica com bandas G. O uso de *array-CGH* é especialmente valioso em recém-nascidos com anomalias congênicas de etiologia desconhecida, ou em casos nos quais os resultados do cariótipo não puderam ser obtidos. Além disso, ainda que a interpretação dos resultados deva ser refinada, este método já é uma ferramenta robusta e precisa, a qual pode ser considerada na primeira linha de investigação de anomalias congênicas para a análise prospectiva/retrospectiva de amostras de DNA em programas de monitoramento de defeitos congênicos.

## Introduction

Although Mendelian, chromosomal and environmental causes have been established for many congenital anomalies and dysmorphic syndromes, the precise etiology of several such conditions has not yet been identified. Etiologic investigations of congenital anomalies suggest that 6% of birth defects are related to chromosomal abnormalities.<sup>1</sup> However, the proportion of chromosomal anomalies in birth defects may be higher. Some individuals with congenital anomalies may have genomic imbalances below the resolution of standard chromosome analysis, which is > 5 Mb. In the last decade, significant developments in the molecular detection of chromosomal imbalances has occurred, and their causal relationship to congenital anomalies and mental disabilities has increased. The considerable gap between the resolution for detection of chromosome abnormalities with light microscopy and molecular gene analysis was bridged with the introduction of molecular approaches, such as microarray-based Comparative Genomic Hybridization (*array-CGH*). *Array-CGH* is currently the most powerful method for the simultaneous detection of chromosomal imbalances and the most prevalent chromosome abnormalities. *Array-CGH* allows the detection of trisomies and large chromosomal anomalies (already recognized by standard karyotype analysis) as well as smaller submicroscopic chromosomal imbalances (deletions, duplications, or triplications of any chromosomal region, few of which are recognized by FISH) that result in copy-number variations (CNVs). Several studies have shown that the use of array-based technologies increases the detection rate of chromosomal abnormalities to approximately 14%-18%, compared to a rate of approximately 3% (excluding trisomy 21) using standard cytogenetic approaches in individuals with developmental delay, intellectual disability, learning difficulty, multiple congenital abnormalities (MCAs), autistic spectrum disorders, schizophrenia and other

neuropsychiatric disorders.<sup>2</sup>The overall frequency of unbalanced chromosome abnormalities was reported in neonates as 0.43%, according to recent reports.<sup>3,4</sup> Therefore, the introduction of genome-wide *array-CGH* analysis at the neonatal period, when few clinical findings related to recognized causes may be present, potentially increases the possibility of early detection of chromosomal abnormalities consistent with a genetic/genomic disorder.

Therefore, the aim of this study was to identify chromosomal imbalances using a retrospective whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization (*array-CGH*) analysis in stored DNA samples of neonates with congenital anomalies of unknown cause. In addition, this study evaluated the contribution of *array-CGH* as a first-line diagnostic tool in neonates with congenital anomalies evaluated by a birth defects monitoring program at a public maternity hospital in Southern Brazil.

## Methods

### Sample selection

This study (with a retrospective approach) was performed using de-identified blood DNA samples of neonates, obtained from the biorepository of the Birth Defects Monitoring Program (PMDC) of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Subjects were less than 30 days of age and presented a wide range of congenital anomalies of unknown cause and in whom a chromosomal abnormality was suspected. The clinical indications for cytogenetic analysis at the time of referral were taken from the clinical and laboratory data collected at birth, available at hospital records, and do not include follow-up investigations and information about disease outcomes. Cases without enough clinical data were excluded, as well as cases where mothers had clinical or laboratory suspicion of infectious/parasitic diseases or a history of use/abuse of illicit

drugs/alcohol during pregnancy. According to these criteria, a total of 45 samples were selected, but 10 of these samples were excluded because they did not achieve the optimal DNA quality needed for the array-CGH analysis, being the study carried out with 35 samples. The results of previous chromosome analyses were obtained in 32 cases. Conventional cytogenetic testing at the 500-550 band level resolution was initially normal for all cases, but in one case a report of an abnormal karyotype was provided later. This study was approved by the IRB/HCPA and was conducted in accordance with current institutional ethics rules regarding the use of biological materials from biorepositories.<sup>5</sup>

#### Whole-genome Array CGH

We performed oligonucleotide array-based CGH using an 8x60 K whole-genome platform (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), which has an average spacing of 40 kb between probes. Genomic DNA analyzed was isolated from the peripheral blood of 35 neonatal individuals provided by the PMDC-HCPA. For each experiment, a gender-mismatched normal reference (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. The experiments were performed according to the manufacturer's protocol. Images of the arrays were taken using a microarray scanner (G2600D) and processed using Feature Extraction software (v9.5.1), both from Agilent. The raw data were analyzed by Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 software with the statistical algorithm ADM-2, using a threshold of 6.0 and a 4-probe minimum aberration call. Subsequent software normalization of the data was performed for the verification of DNA copy number changes. The P values for each probe were calculated, providing additional objective statistical criteria to determine whether the deviation of each probe from zero was statistically significant.<sup>6</sup>All experiments included two array hybridizations per

sample, and the results were recorded and compared. Only genomic imbalances detected in both dye-swap experiments were reported.

### Data Analysis

Whole-genome array-CGH data analyses were performed in a blinded fashion; samples were received, de-identified, and investigators who performed the array-CGH analyses were not aware of the previous clinical and laboratory information related to each sample. The DNA copy number variations (CNVs) detected were compared with CNVs reported in publicly available online resources and databases of chromosomal abnormalities and variants.<sup>7-13</sup> We classified the CNVs (gain/duplication or losses/deletions) into different categories: benign CNV (normal genomic variant); CNV of uncertain clinical relevance (variant of uncertain significance -VOUS); and CNV of possible clinical relevance (pathogenic variant). In this study, the pathogenic abnormalities included the detection of CNVs in known pathogenic regions, deletion/duplication >3 Mb in size or visible by G-banded karyotype that have not been reported in the normal population, and deletions or duplications <3 Mb previously reported as pathogenic. Benign deletions or duplications included variants well documented in the normal population or previously reported as benign. Deletions or duplications were classified as being VOUS when insufficient evidence was available to conclude if the CNV was either pathogenic or benign.

### Results

The data of the 35 neonates with congenital anomalies of unknown cause, born between July 2011 and December 2012, whose DNA samples were analyzed by whole-genome array-CGH, is presented in Table 1. The maternal age ranged from 16 to 41 years. We identified 12 (34.3%) cases with DNA copy number variations (CNVs). From those cases, 7/12 (58.3%) were male and 5/12 (41.7%) were female. The details of the

array-CGH results from the cases with genomic imbalances are summarized in Table 2. Thirteen CNVs were identified in 12 individuals. Overall, duplications were verified in 6/35 (17%) and deletions in 7/35 (20%) of the chromosomal imbalances. In 6/35 (17%) cases, only a deletion was identified; 5/35 cases (14.3%) only had a duplication, and 1/35 (2.8%) had a deletion and a duplication. Additionally, a fluorescence in situ hybridization (FISH) test confirmed the array-CGH results in 1 deletion case (case 14) from which stored cells were available (data not shown).

Among the 5 individuals with syndromic or non-syndromic orofacial clefts (cases 14, 25, 30, 34, and 37) in whom genomic imbalances were detected, we found in 1 case a clinically significant 7.2 Mb deletion at chromosome 17p13.3-p13.1 (case 14) that coincides with the known Miller-Dieker syndrome (MDS) region. FISH analysis confirmed the deletion of chromosome 17p13.3 region (data not shown). The other 4 cases with oral facial clefts showed CNVs that were classified as benign or as VOUS. Of the 2 cases with arthrogyrosis multiplex congenital (17 and 31), we found in 1 individual an interstitial duplication of the long arm of chromosome 6 at band q22.31-q27 and a terminal deletion of the long arm of chromosome 1 at band q44. The previous karyotype analysis showed the identification of a chromosomal abnormality of unknown origin involving the long arm of chromosome 6 but not the chromosomal imbalance that involved chromosome 1. This infant died at the age of 35 days. Of 5 additional cases with MCAs (1, 16, 22, 38 and 48), we identified clinically significant chromosomal imbalances or potential pathogenic CNVs in 3 cases (1, 31, and 48). The subjects died at the age of 2 days, 5 hours and 3 days after birth, respectively. Overall, the deletions were classified as pathogenic in 3 cases (1, 14, and 48), as benign in 2 cases (16 and 30), and as VOUS in 2 cases (17 and 31). The duplications were classified as pathogenic in 1 case (31), as benign in 2 cases (34 and 38) and as VOUS in 3 cases

(cases 22, 25 and 37). Examples of array-CGH graphical overviews are shown in Figure 1.

## Discussion

The aim of this study was to retrospectively identify genomic imbalances using whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in samples available from neonates with congenital anomalies of unknown etiology. In addition, this study evaluated the contribution of array-CGH as a first-line diagnostic tool in neonates with congenital anomalies in a birth defects monitoring program at a public maternity hospital in Southern Brazil.

To date, the largest newborn screening (in 20,126 unselected cases) using array-CGH analysis as a first-line test revealed that 87/20,126 (0.43%) of the neonatal cases had chromosomal imbalances (53 cases of aneuploidies, 23 deletions and 11 duplications).<sup>4</sup>

Reddy et al<sup>14</sup> reported the results of a population-based study of 532 stillbirths. In this sample, array-CGH analysis yielded more results than did karyotype analysis (87.4% vs 70.5%), provided better detection of genetic abnormalities (aneuploidy or pathogenic CNVs, 8.3% vs 5.8%) and also identified more genomic imbalances among 67 stillbirths with congenital anomalies (29.9% vs 19.4%).

When selective screening is performed, the use of array-based technologies demonstrated the ability to detect pathogenic imbalances in approximately 14-18% of cases with developmental delay, intellectual disability, and MCAs referred for analysis.<sup>2,15-18</sup> Our study verified genomic imbalances in 4/35 (11.4%) of the cases that could be defined as pathogenic and causally related to the abnormal phenotypes.

Although our study was performed in a relatively small cohort, the rate of positive findings detected through array-CGH is in the range reported in several postnatal series.

Although a clear association exists between CNVs in both syndromic and non-syndromic congenital anomalies, only few large cohort studies have specifically performed whole-genome array-CGH analysis in samples of neonates with birth defects. Lu et al<sup>19</sup> reported the frequency of genomic imbalances identified in 638 neonates with various birth defects referred for chromosomal microarray analysis. They used 3 different array platforms with increasingly extensive genomic coverage and compared the results obtained. Overall, 17.1% of patients were identified with clinically significant abnormalities, with detection rates of 13.7%, 16.6% and 19.9%, depending on the array platform used.

In the present study, a previous karyotype analysis was available in 32 cases showing that the frequency of chromosomal imbalances detected was 1/32 (3.1%). The detection yield of genomic imbalances not previously detected by karyotype analysis increased to 9/32 cases (28%) with the use of array-CGH, in agreement with the expected increased detection yield. In 4/35 cases (11.4%), CNVs could be defined as pathogenic and causally related to the abnormal phenotypes. Rate differences between different studies may be due to the cohort size, differences in the resolution of the array platform used, the criteria for patient selection and the interpretation of the clinical relevance of the CNVs.

Among the 4/35 pathogenic cases, in 2 cases (31 and 48), the abnormalities found had not been previously associated with well-recognized syndromes. In the 2 other cases (1 and 14), causative alterations had already been associated with well-defined microdeletion syndromes<sup>20</sup> (Wolf-Hirschhorn Syndrome-WHS, and MDS, respectively). In these 2 cases with CNVs associated with well-defined genetic

disorders, the chromosomal imbalances could have been previously diagnosed by karyotype analysis or by FISH analysis alone (using locus-specific probes for the critical chromosome region) if the clinical findings at the time of referral were indicative of a particular microdeletion syndrome that could inform exactly which region(s) and/or chromosome(s) to investigate. However, both samples were from subjects in whom neither karyotype nor FISH analysis results were available. Certain genetic disorders, such as WHS and MDS, are microdeletion syndromes with CNV of variable size known to be caused by dosage-sensitive genes, and atypical recognized syndromes associated with non-recurrent microdeletions might be clinically missed at birth. Furthermore, even in a well-defined syndrome, non-recurrent chromosome deletions can be of different sizes, leading to a broad phenotypic spectrum.

One of the 2 cases with arthrogryposis multiplex congenita (case 31) showed a large duplication of the long arm of chromosome 6 at bands q22.31-q27 and a smaller deletion of the long arm of chromosome 1 at band q44. The retrieval of laboratory records showed that a chromosomal abnormality of unknown origin involving the long arm of chromosome 6 was previously recorded, but no chromosomal imbalance involving chromosome 1 was identified. At that time, there was the expectation that parental karyotypes would be performed to better define the type and origin (if *de novo* or familial) of the extra material on chromosome 6. Array-CGH analysis allowed for additional genomic information regarding the duplication at chromosome 6 previously identified and the detection of an additional genomic imbalance (deletion at chromosome 1) that was not previously reported. Frequently, more than one CNV is identified in an individual. It is evident already from the karyotype analysis that the large chromosome duplications must involve many genes and be causally related to the

congenital anomalies, as assumed in case 31. However, it has been recognized that the presence of another CNV could reduce or aggravate the clinical phenotype.<sup>21,22</sup>

From the 2 samples with syndromic cleft lip and/or cleft palate (cases 14 and 34) and the 3 with non-syndromic cleft lip and cleft palate (cases 25, 30, and 37), 1 case (14) had a clinically significant 7.2 Mb deletion at chromosome 17p13.3-p13.1 that coincides with the known MDS microdeletion syndrome. In the other 4 cases, benign CNVs (30 and 34) or VOUS were identified (cases 25 and 37). Approximately 30% of cleft lip and palate cases and 50% of cleft palate cases are recognized as components of MCA syndromes.<sup>23</sup>

However, both genetic and environmental factors are known to contribute to the occurrence of cleft lip and palate, making it complicated to elucidate the causative mechanisms. Considerable efforts have been made seeking candidate gene(s) for non-syndromic clefts through array-CGH, showing it is an effective method for isolating candidate loci.<sup>24,25</sup>

The clinical relevance of 5/13 (36.7%) CNVs among the 12 cases with genomic imbalances remains uncertain at present, as there is insufficient evidence to conclude if the CNVs were either pathogenic or benign. When CNVs are detected that have no strong track record for clinical importance, the interpretation of whether they are causal for the birth defect can be challenging. We should also consider that the CNV is potentially inherited from a healthy parent and, in this case, could be a pathogenic variant with incomplete penetrance or a benign familial variation. The highly variable nature of the genome means that care must be taken in assigning pathogenicity to CNVs detected by array-CGH. From the CNVs classified as being VOUS in this study, we might expect that parental studies would be performed to allow a better interpretation and to provide valuable information for genetic counseling prior to a future pregnancy.

Indeed, it is important to report data on chromosome imbalances with unclear clinical significance because some of the data may represent recurrent CNVs that could be associated with novel syndromes. Reports of patients with similar genomic imbalances and clinical findings can lead to the identification of newly recognized genomic disorders or candidate genes associated with isolated congenital anomalies.

In 4 cases (16, 30, 34 and 38), normal variants classified as benign were detected. It is recognized that all humans differ in their chromosomes at the submicroscopic level and that CNVs occur with high frequency, with copy number polymorphisms being present in >5% of the population.<sup>26,27</sup> CNVs are often relatively small, can be inherited from a phenotypically normal parent, occur in more gene-sparse chromosomal regions and contain more repetitive DNA sequences. The detection of benign CNVs was reported in this study even from genomic regions that consistently harbor benign variants; this might reduce the need to perform parental studies in neonates in whom proven benign CNVs were identified.

A limitation of this study was the inability to distinguish *de novo* from inherited genomic imbalances due to the unavailability of parental DNA. *De novo* CNVs in clinically significant gene regions are more likely to be causative. However, inherited pathogenic CNVs should not be excluded as a cause of congenital anomalies because of their variable expressivity and incomplete penetrance.<sup>28 and 29</sup> Pathogenic CNVs may be inherited from an apparently normal parent and contribute to the abnormal phenotype in the child. These types of CNVs are thought of as susceptibility loci, in that they increase the chance of a child developing congenital anomalies but may not be sufficient to cause a phenotype by themselves. Parental studies must be recommended for the individuals for whom clinically significant findings were reported, to determine whether the CNVs findings represent *de novo* or familiar events. Although several common strategies have

been proposed to help interpret the findings of genomic imbalances,<sup>29,30</sup> there are no universal criteria thus far. It is essential to have the most accurate and up-to-date information on the clinical significance of detected genomic imbalances as well as CNVs at different positions in the genome, pathogenic mutations or polymorphisms in other individual genes or nongenetic causes that might be required for a congenital anomaly to be expressed. Caution must be taken in the clinical interpretation of the array-CGH results. Further consultations at genetics clinics and extended analysis in family members may be necessary to provide accurate counseling to the families.

A typical weakness of retrospective studies is the limited clinical information available. We retrieved the clinical information available from the hospital records during the first referral. Most of these were recorded at the time of the first laboratory requirements and were therefore preliminary. Of note, 6/35 (17%) neonates with congenital anomalies died soon after birth. Nevertheless, we consider this cohort representative of the neonates in whom the presence of chromosomal imbalances was suspected.

With this study, we demonstrated the feasibility and usefulness of array-CGH to identify deletions and duplications in stored DNA samples. It was shown that a proportion of neonates with congenital anomalies of unknown cause had chromosomal imbalances associated with their phenotypes. Furthermore, this study demonstrated the detection of chromosomal abnormalities consistent with genetic syndromes at an early age, when often, only a few clinical findings are clear.

In conclusion, retrospective or prospective array-CGH as a first-line diagnostic tool would benefit families by providing a more accurate diagnosis and impact the overall management in a significant number of cases from birth defects monitoring programs.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support (grant402012/2010-0)

## References

1. Schinzel A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. 2nd ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2001. 966pp.
2. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135:174-202.
3. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:521-6.
4. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Chung HD, Kang HY. The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns. *Mol Cytogenet.* 2013;6:1-5.
5. 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; 30:170-179.

6. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53:413-22.
7. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources (Decipher); [cited 2014 Jan 26]. Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk/>
8. Database of Genomic Variants (DGV); [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://projects.tcag.ca/variation>
9. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>
10. Ensembl Genome Browser; [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>
11. The International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA); [cited 2014 Feb 23] Available from: <https://www.iscaconsortium.org/index.php>
12. National Center for Biotechnology Information (NCBI); [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
13. University California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser; 2002 [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://genome.ucsc.edu/>
14. Reddy UM, Page GP, Saade GR, Silver RM, Thorsten VR, Parker CB, Pinar H, Willinger M, Stoll BJ, Heim-Hall J, Varner MW, Goldenberg RL, Bukowski R, Wapner RJ, Drews-Botsch CD, O'Brien BM, Dudley DJ, Levy B; NICHD Stillbirth Collaborative Research Network. Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. *N Engl J Med.* 2012;367:2185-93.

15. Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, Zelenova MA, Silvanovich AP, Yurov YB. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Mol Cytogenet.* 2012; 5:46.
16. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012; 367:2175-84.
17. Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet.* 2013;5:16.
18. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41:610-20.
19. Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang SH, Lalani S, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics.* 2008;122:1310-8.
20. Vissers LE, Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol.* 2012;838:29-75.
21. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367:1321-1331.

22. Girirajan S. Genomic disorders: complexity at multiple levels. *Genome Med.* 2013; 29;5:43.
23. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 2004;13(Spec No 1):R73–81.
24. Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM et al. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *Vis J Med Genet.* 2008;45:81.
25. Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;15:42–51.
26. 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;36:949-51.
27. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;23;444:444-54.
28. Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW; Working Group of the American College of Medical Genetics. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med.* 2011;13:676-9.
29. Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM et al. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet.* 2012; 81:403-12.

30. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat.* 2012 Feb 14 . [Epub ahead of print].

Table 1. Summary of the clinical indications from the 35 samples at the time of referral for chromosomal analysis

Case #	Main clinical associated features
1†	Female, CDH, microtia, hypertelorism, CHD (dextroposition of the heart), anal atresia
2	Male, CHD (Tetralogy of Fallot)
4	Male, omphalocele, microcephaly
5	Male, omphalocele, limb agenesis, ambiguous genitalia, anal atresia, bladder dysfunction
10	Female, gastroschisis
12†	Male, CDH
13	Male, unilateral phocomelia, hip dysplasia
14	Male, cranial asymmetry, cleft palate (soft), ocular hypertelorism, esophageal atresia type IIIB, camptodactyly of the 3th, 4th and 5th fingers, clinodactyly of the 5th finger, clubfeet
15	Male, anal atresia, club feet
16	Female, anal atresia, hypoplastic genitalia, CHD
17	Female, arthrogryposis multiplex congenita (amyoplasia)
19	Female, non-syndromic unilateral cleft lip (left) and cleft palate
22†	Female, microcephaly, cerebellar hypoplasia, oligohydramnios, pulmonary hypoplasia, renal dysplasia, genital hypoplasia, frontal microgyria, occipital encephalocele, cerebellar hypoplasia
23	Female, omphalocele, microcephaly
24	Male, micrognathia, single upper median incisor
25	Female, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
29	Male, CHD (Tetralogy of Fallot)
30	Male, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
31†	Male, arthrogryposis multiplex congenita (amyoplasia), CHD (Tetralogy of Fallot), hip dysplasia
32†	Female, bilateral multicystic dysplastic kidney, oligohydramnios
33	Male, cleft palate, clubfeet
34	Male, cleft lip (left) and cleft palate, widow's peak, widely spaced nipples, genital hypoplasia, hypospadias
35	Female, HPE, oligohydramnios, microcephaly, unilateral choanal atresia
37	Male, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
38	Male, esophageal atresia type IIIB
40	Male, intrauterine growth retardation
41	Female, gastroschisis
42	Female, CHD (Tetralogy of Fallot)
43	Male, non-syndromic cleft palate
44	Male, microgyria, incomplete lissencephaly, micrognathia
46	Male, meningocele, club foot (left)
47	Female, gastroschisis
48†	Male, bilateral multicystic dysplastic kidney, oligohydramnios, bilateral pulmonary hypoplasia
49	Female, gastroschisis
50	Male, arthrogryposis multiplex congenita, micrognathia

† died; CDH, congenital diaphragmatic hernia; CHD, congenital heart defect; HPE, holoprosencephaly

Table 2. Details of the array-CGH from 12 samples with chromosomal imbalances

Case	Del/Dup	Chromosome band location	Size (Mb)	Genomic coordinates (hg 19)	Classification	Main clinical associated features
1†	del	4p16.3-p15.33	12.90	71,552-12,976,346	Pathogenic	Female, CDH, microtia, hypertelorism, CHD (dextroposition of the heart), anal atresia
14	del	17p13.3-p13.1	7.22	87,309-7,306,339	Pathogenic	Male, cranial asymmetry, cleft palate (soft), ocular hypertelorism, esophageal atresia type IIIB, camptodactyly, clinodactyly of the 5th finger, clubfeet
16	del	8p11.2	0.13	39,258,894-39,386,158	Benign	Female, anal atresia, club feet
17	del	11p14.2-p14.1	0.22	27,006,061-27,225,374	VOUS	Female, distal arthrogryposis, club feet
22†	dup	9q31.3-q32	1.53	113,919,284-115,449,137	VOUS	Female, microcephaly, cerebellar hypoplasia, oligohydramnios, pulmonary hypoplasia, renal dysplasia, genital hypoplasia, frontal microgyria, occipital encephalocele, cerebellar hypoplasia
25	dup	9p13.3-p13.2	1.89	36,163,040-38,050,778	VOUS	Female, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
30	del	15q11.1-q11.2	1.91	20,575,646-22,486,999	Benign	Male, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
31†	del	1q44	1.52	247,695,693-249,212,668	VOUS	Male, arthrogryposis multiplex congenita (amyoplasia), CHD (Tetralogy of Fallot), hip dysplasia
	dup	6q22.31-q27	49.75	118,718,417-168,473,515	Pathogenic	
34	dup	22q11.23	0.23	25,664,618-25,892,253	Benign	Male, cleft lip (left) and cleft palate, widow's peak, widely spaced nipples, genital hypoplasia, hypospadias
37	dup	3q29	0.19	197,574,293-197,766,791	VOUS	Male, non-syndromic cleft lip and palate (bilateral)
38	dup	2p22.3	0.64	32,654,837-33,294,782	Benign	Male, esophageal atresia type IIIB
48†	del	10q26.3	2.37	132,720,766-135,089,504	Pathogenic	Male, bilateral multicystic dysplastic kidney, oligohydramnios, bilateral pulmonary hypoplasia

† died; CDH, congenital diaphragmatic hernia; CHD, congenital heart defect; HPE, holoprosencephaly; VOUS, variant of uncertain significance

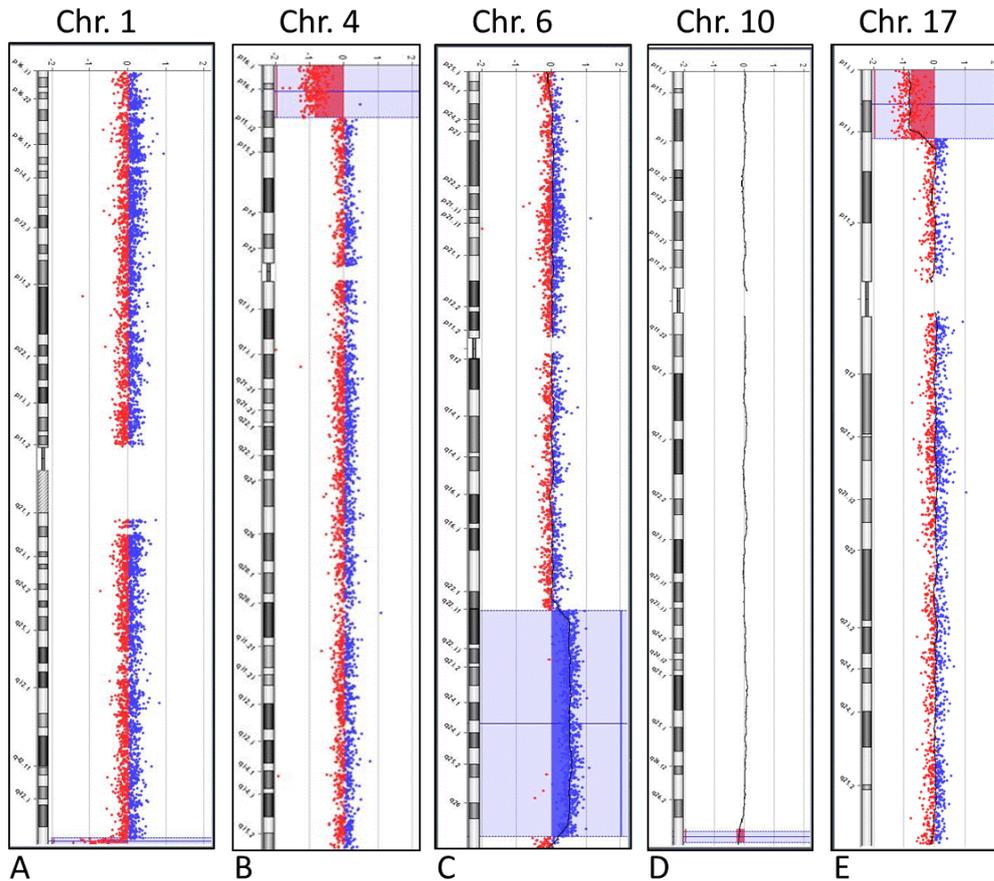


Figure 1. Array-CGH ratio profiles of the chromosomes with pathogenic chromosomal imbalances using genomic DNA from neonates (test; in red) and DNA from normal subjects as a control (reference; in blue). The test/reference ratio data for each chromosome are shown. Each dot represents a single probe (oligo) spotted on the array. The log ratio of the chromosome probes is plotted as a function of chromosomal position. Copy number loss shifts the ratio to the left (value of approximately  $-1x$ ). Copy number gain shifts the ratio to the right (value of approximately  $+1x$ ). The ideogram of each chromosome (left margin) shows the location of each probe. The probe log<sub>2</sub> ratios were plotted according to genomic coordinates (based on the UCSC Genome Browser, February 2009, NCBI Build 37 reference sequence). A: A ~1.5-Mb terminal deletion at chromosome 1q44 (blue line) in case 31. B: A ~12.9-Mb terminal deletion at chromosome 4p16.3-p15.33 (blue box) in case 1. C: A ~ 49.7-Mb interstitial duplication at chromosome 6q22.31-q37 (blue box) in case 31. D: A ~ 2.37-Mb terminal deletion at chromosome 10q26.3 (blue box) in case 48. E: A ~ 7.2-Mb terminal deletion at chromosome 17p13.3-p13.1 (blue box) in case 14.

## **CAPÍTULO 4**

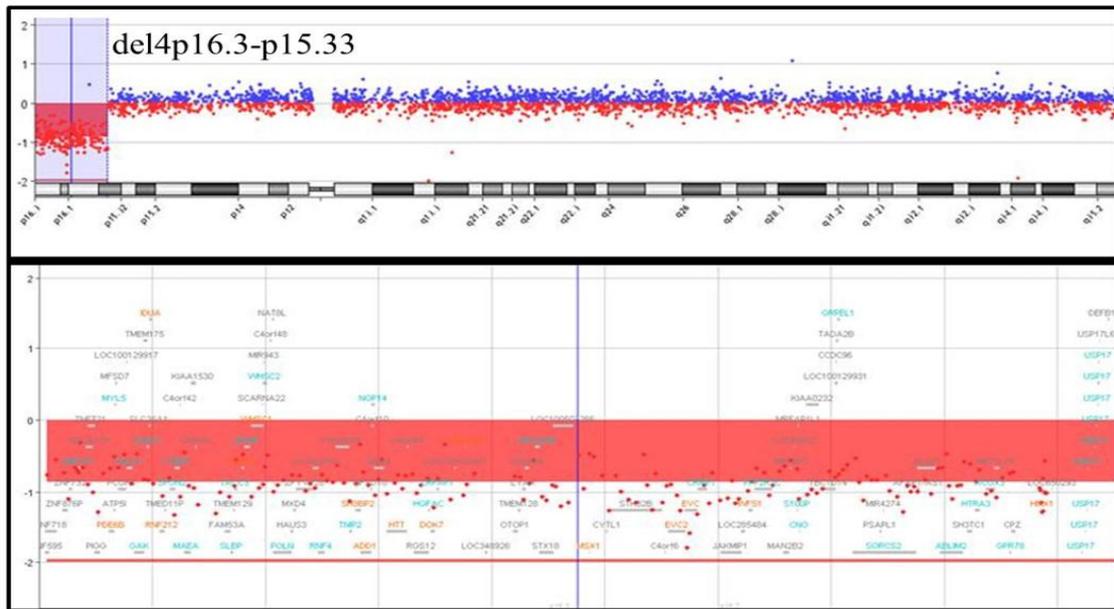
Caracterização citogenômica dos rearranjos cromossômicos identificados por *array-CGH*

---

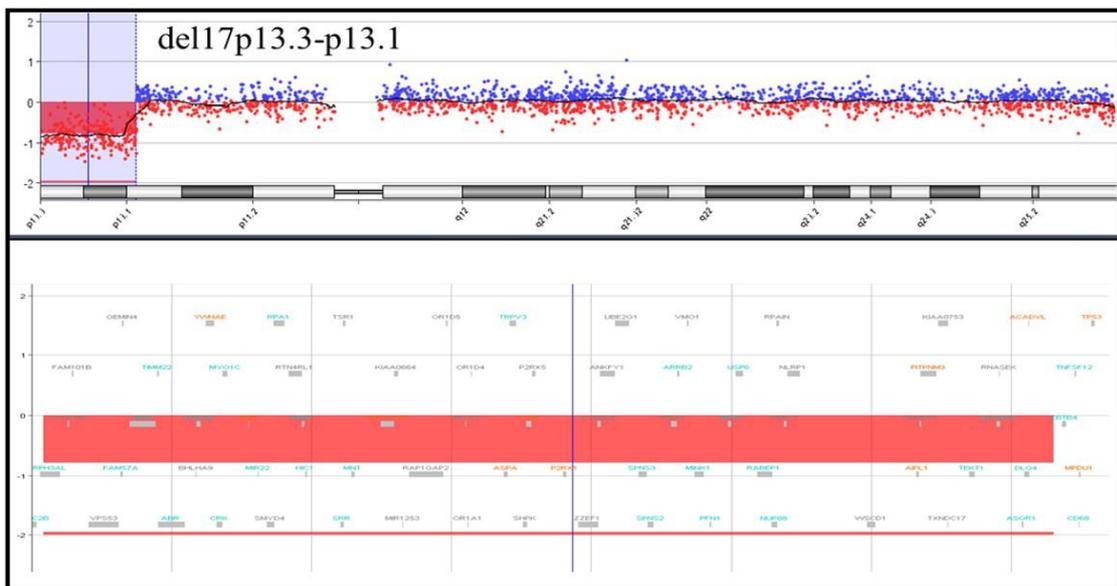
O desenvolvimento e a expansão da biologia molecular e das técnicas citogenéticas têm permitido a descrição de diversos tipos de variantes genômicas que contribuem para o entendimento das doenças genômicas e das variações genotípicas normais na população. As variantes estruturais (*SVs*) dos genomas individuais resultam de rearranjos cromossômicos que afetam ao menos 50bp e incluem deleções e duplicações, inversões e translocações cromossômicas (Le Scouarnec & Gribble, 2012). A determinação precisa dos pontos de quebra e os limites das regiões envolvidas é fundamental para uma precisa correlação genótipo-fenótipo, e fornece informações sobre os mecanismos moleculares associados à origem dos rearranjos cromossômicos que levam a variantes genômicas estruturais.

A escolha das regiões incluídas na pesquisa de alterações cromossômicas ou genômicas define sua classificação em dois tipos: o *array*-CGH representativo do genoma inteiro e o direcionado para regiões específicas, geralmente envolvidas em rearranjos cromossômicos já descritos. Além da identificação das alterações cromossômicas detectáveis pela análise cromossômica convencional, a aplicação de *array*-CGH tem permitido a detecção da variação do número de cópias genômicas e a caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais. 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 às doenças genéticas.

A seguir, apresentamos a caracterização citogenômica das 13 regiões cromossômicas com desequilíbrios genômicos detectados por este estudo.

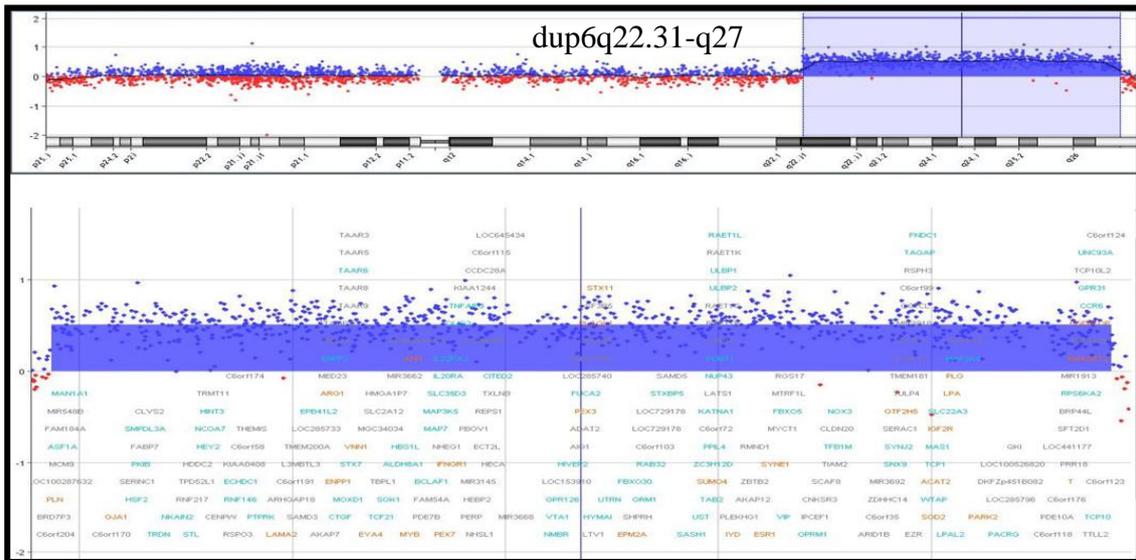


A

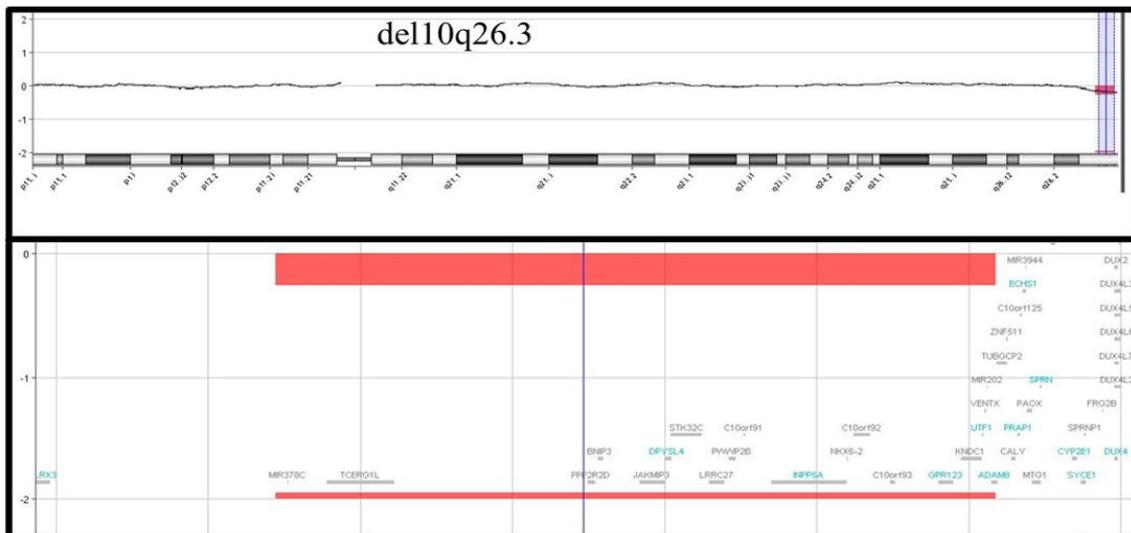


B

Figura 1. Representação dos segmentos cromossômicos detectados em 2 amostras de neonatos com malformações congênitas e desequilíbrios genômicos classificados como patogênicos e associados a síndromes de genes contíguos. Imagem de *Array CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em DNA de recém-nascidos (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico indica a posição cromossômica do segmento alterado. A barra horizontal (vermelha ou azul) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 4. Abaixo, representação gráfica dos genes da região alterada (em vermelho). *Array CGH* da amostra 1 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço curto do cromossomo 4p16.3-p15.33, de ~12.9 Mb de tamanho (chr4: 71,552-12,976,346) e, (B) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 17. Abaixo, representação gráfica dos genes da região alterada (em vermelho). *Array CGH* da amostra 17 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço curto do cromossomo 17p13.3-p13.1, de ~7.22 Mb de tamanho (chr17: 87,309-7,306,339).

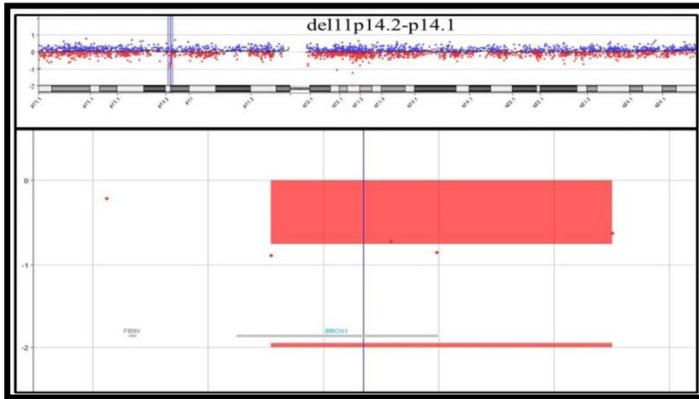


A

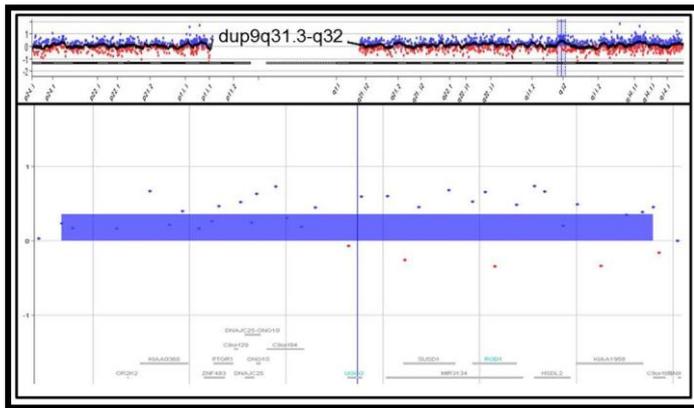


B

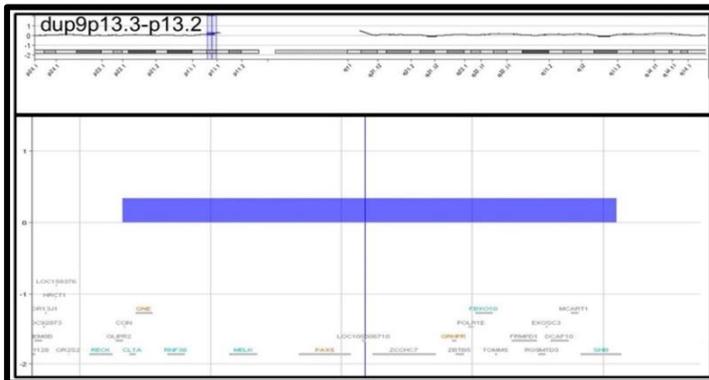
Figura 2. Representação dos segmentos cromossômicos detectados em 2 amostras de neonatos com malformações congênitas e desequilíbrios genômicos classificados como patogênicos. Imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em DNA de recém-nascidos (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico indica a posição cromossômica do segmento alterado. A barra horizontal (vermelha ou azul) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 6. Abaixo, representação gráfica dos genes da região alterada do cromossomo 6 (em azul). Array-CGH da amostra 31 mostra uma duplicação intersticial do braço longo do cromossomo 6q22.31-q27, de ~49.75 Mb de tamanho (chr6:118,718,417-168,473,515) e, (B) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 10. Abaixo, representação gráfica dos genes localizados na região alterada (em vermelho). Array CGH da amostra 48 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço longo do cromossomo 10q26.3, de ~ 2.37 Mb de tamanho (chr10: 132,720,766-135,089,504).



A

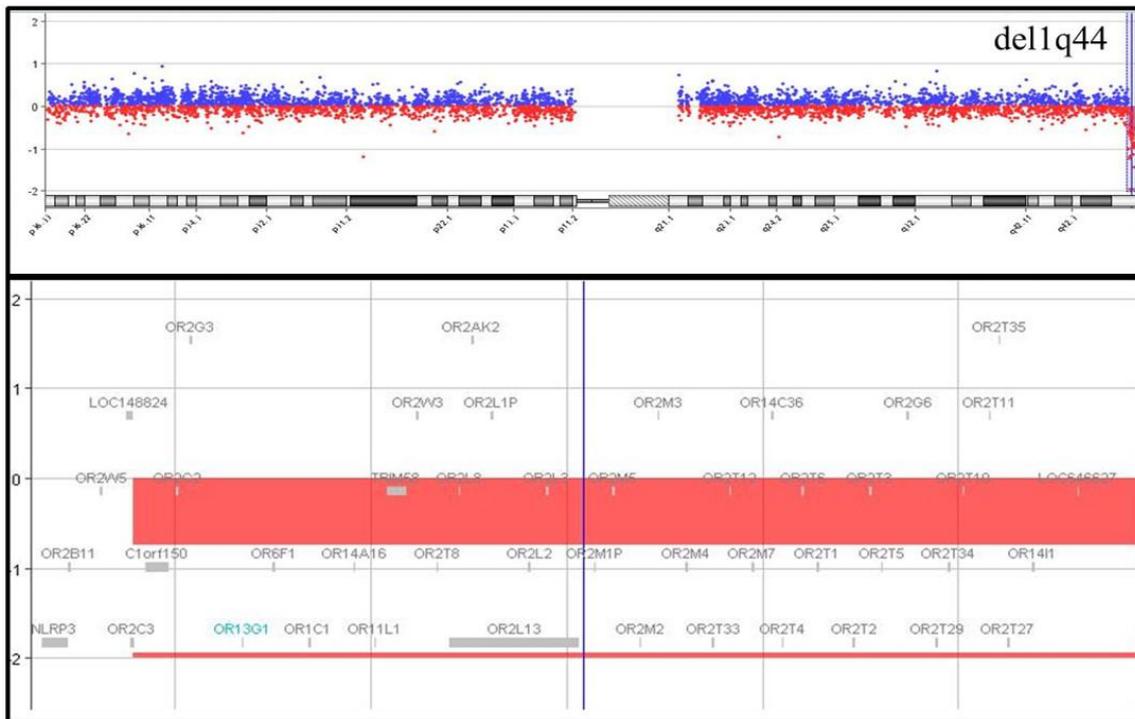


B

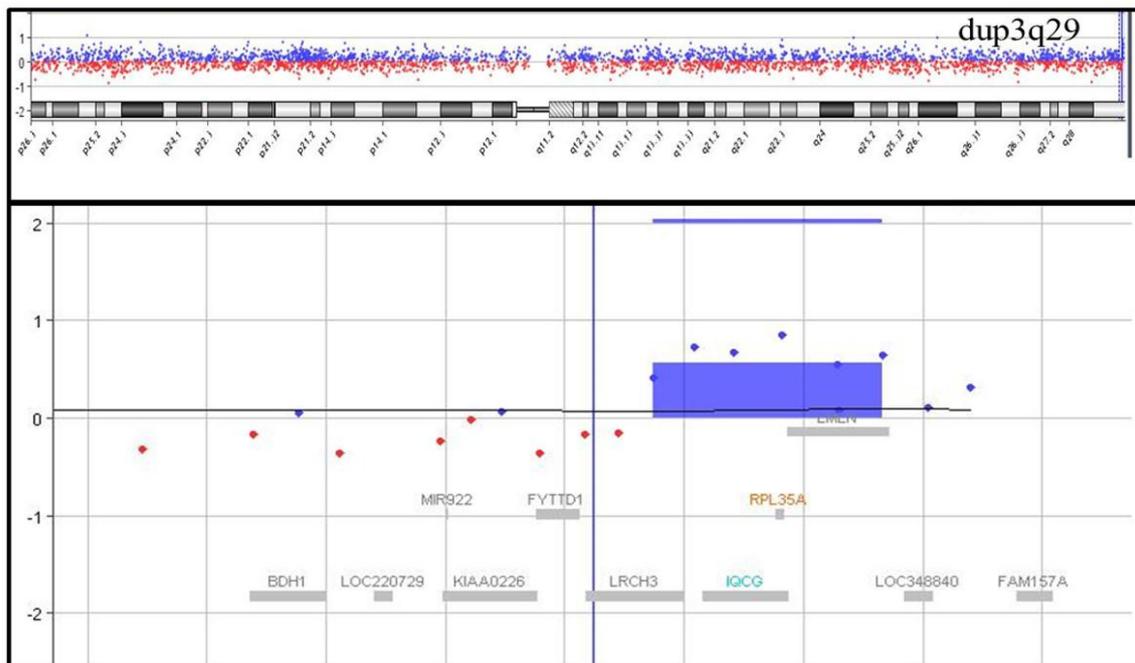


C

Figura 3. Representação dos segmentos cromossômicos em 3 neonatos com malformações congênitas e desequilíbrios genômicos classificados como de significado incerto ou inconclusivo. Imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA de recém-nascidos (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossomômico mostra a posição genômica do segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho ou azul) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) *array-CGH* da amostra 17 mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço curto do cromossomo 11p14.2-p14.1, de ~0.22 Mb de tamanho (chr11: 27,006,061-27,225,374); (B) *array-CGH* da amostra 22 mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 9q31.3-q32, de ~1.53 Mb de tamanho (chr9: 113,919,284-115,449,137) e, (C) *array-CGH* da amostra 25 mostra uma duplicação intersticial do braço curto do cromossomo 9p13.3-p13.2, de ~1.89 Mb de tamanho (chr9:36,163,040-38,050,778).

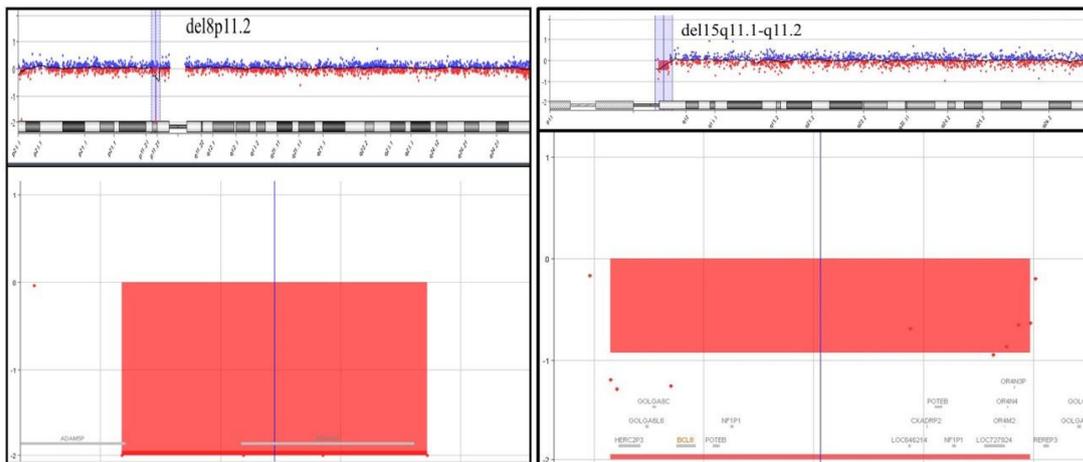


A



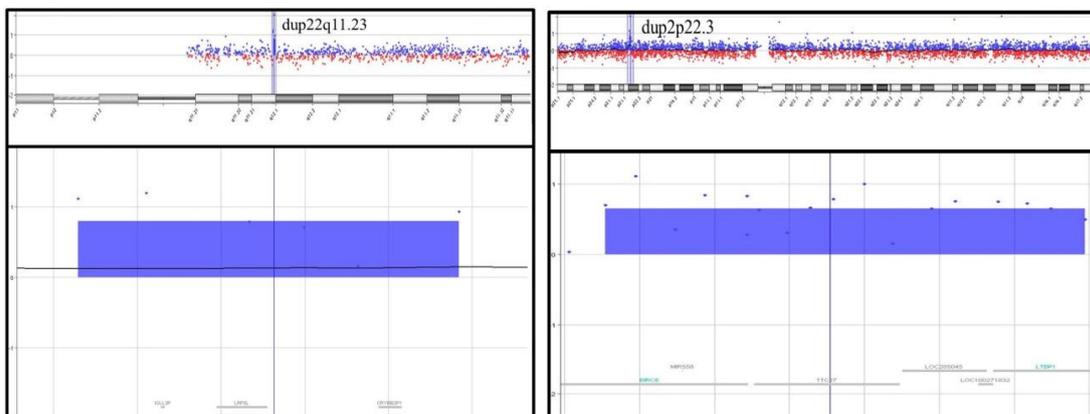
B

Figura 4. Representação dos segmentos cromossômicos em 2 neonatos com malformações congênitas e desequilíbrios genômicos classificados como de significado incerto ou inconclusivo. Imagem de *Array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA de recém-nascidos (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra a posição genômica do segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho ou azul) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) *Array-CGH* da amostra 31 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço longo do cromossomo 1q44, de ~ 1.52 Mb de tamanho (chr1:247,695,693-249,212,668) e, (B) *array-CGH* da amostra 37 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço longo do cromossomo 3q29, de ~ 0.19 Mb de tamanho (chr3:197,574,293-197,766,791).



A

B



C

D

Figura 5. Representação dos segmentos cromossômicos detectados em 4 amostras de neonatos com malformações congênitas e desequilíbrios genômicos classificados como benignos. Imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em DNA de recém-nascidos (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico indica a posição cromossômica do segmento alterado. A barra horizontal (em vermelho ou azul) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) *array-CGH* da amostra 16 mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço curto do cromossomo 8p11.2, de ~0.13 Mb de tamanho (chr8:39,258,894-39,386,158); (B) *array-CGH* da amostra 30 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço longo do cromossomo 15q11.1-q11.2, de ~1.91 Mb de tamanho (chr15:20,575,646-22,486,999); (C) *array-CGH* da amostra 34 mostra uma duplicação intersticial do braço longo do cromossomo 22q11.23, de ~0.23 Mb de tamanho (chr22:25,664,618-25,892,253); (D) *array-CGH* da amostra 38 mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço curto do cromossomo 2p22.3, de ~ 0.64 Mb de tamanho (chr2:32,654,837-33,294,782).

Tabela 1. Caracterização citogenômica dos desequilíbrios genômicos significativos detectados por array CGH em 12 amostras incluídas no estudo.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
<b>#1: 4p16.3-p15.33: 71,552-12,976,346</b>	
<i>ABLIM2</i> (Actin-binding lim protein family, member 2)	-
<i>ACOX3</i> (Acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl)	-
<i>ADD1</i> (Adducin 1)	Hipertensão essencial, sensível à sal.
<i>ADRA2C</i> (Adrenergic, alpha-2C-, receptor)	Insuficiência cardíaca e resposta à beta-bloqueadores.
<i>CNO</i> (Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1, subunit 4)	Adequada biogênese das organelas relacionadas aos lisossomos.
<i>CPLX1</i> (Complexin 1)	Regula vesícula sináptica na excitose.
<i>CRMP1</i> (Collapsin response mediator protein 1)	-
<i>CTBP1</i> (C-terminal-binding protein 1)	Atua no controle do equilíbrio de estruturas do Complexo de Golgi.
<i>DGKQ</i> (Diacylglycerol kinase, theta, 110-KD)	-
<i>DOK7</i> (Downstream of tyrosine kinase 7)	Sequência de deformação fetal aquinesia, Miastenia, cintura pélvica e escapular, familiar.
<i>DRD5</i> (Dopamine receptor D5)	Distonia primária cervical; susceptibilidade à déficit de atenção e hiperatividade.
<i>D4S234E</i> ( <i>D4S234E</i> gene)	-
<i>EVC</i> (Ellis-van Creveld syndrome gene)	Síndrome de Ellis-van Creveld, disostose acrodental Weyers.
<i>EVC2</i> ( <i>Libin</i> )	Síndrome de Ellis-van Creveld.
<i>FGFRL1</i> (Fibroblast growth factor receptor-like 1)	-
<i>FGFR3</i> (Fibroblast growth factor receptor-3)	Acondroplasia, câncer de bexiga somático; Síndrome CATSHL; câncer cervical somático; Síndrome de Crouzon com acanthosis nigricans; Hipocondroplasia; Síndrome LADD; Síndrome de Muenke; nevo epidérmico somático; Spermatócito seminoma somático; Displasia tanatofórica tipo I e II.
<i>GAK</i> (Cyclin G-associated kinase)	-
<i>GPR78</i> (G protein-coupled receptor 78)	Estimulante de adenilato ciclase, resultando na elevação do cAMP intracelular.
<i>GRPEL1</i> ( <i>GrpE</i> , homolog of <i>E. coli</i> , 1)	Componente do Complexo PAM (translocação de transcritos de proteínas que contém peptídeos para entrar na membrana da matriz mitocondrial).
<i>HGFAC</i> (Hepatocyte growth factor activator)	-
<i>HMX1</i> (H6 family homeobox 1)	Síndrome óculoauricular.
<i>HTRA3</i> (HTRA Serine peptidase 3)	Cliva beta-caseína/CSN2 bem como vários proteoglicanos da matriz extracelular.
<i>HTT</i> (Huntingtin)	Doença de Huntington.
<i>IDUA</i> (Alpha-L-iduronidase)	Mucopolissacaridose lh, Mucopolissacaridose lh/s, Mucopolissacaridose ls.
<i>LETM1</i> (Leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1)	Manutenção de redes tubulares mitocondriais e para a montagem de supercomplexos da cadeia respiratória, associado a Síndrome de Wolf-Hirschhorn.
<i>LRPAP1</i> (Low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1)	Interage com o receptor <i>LRP1</i> /alfa-2-macroglobulina e glicoproteína 330.
<i>MAEA</i> (Macrophage erythroblast attacher)	Media o ataque das células eritróides para macrófagos maduros.
<i>MSX1</i> (Muscle segment homeo box)	Displasia ectodérmica 3, tipo Wiktop; fenda orofacial 5; agenesia de dentes.
<i>MYL5</i> (Myosin, light chain 5, regulatory)	-
<i>NOP14</i> ( <i>NOP14</i> , homolog of <i>S. cerevisiae</i> )	Atua processo nucleolar do RNA ribossomal pré-18S.
<i>PDE6B</i> (Phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, ROD, beta)	Cegueira noturna congênita estacionária, autossômica dominante 2, Retinitis pigmentosa 40.
<i>POLN</i> (Polymerase DNA, NU)	-
<i>PPP2R2C</i> (Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma isoform)	-
<i>RNF212</i> (Ring finger protein 212)	-
<i>RNF4</i> (Ring finger protein 4)	Envolvidos no alinhamento dos cromossomas e montagem do fuso.
<i>SH3BP2</i> (SH3-domain binding protein 2)	Querubínismo.
<i>SLBP</i> (Stem-loop binding protein)	Segmentação do RNAm da histona madura a partir do núcleo para o citoplasma e para a maquinaria de tradução, estabiliza o RNAm na histona madura.
<i>SLC2A9</i> (Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 9)	Hipouricemia, renal, 2; concentração de ácido úrico, soro.
<i>SORCS2</i> (SORCS receptor 2)	-
<i>SPON2</i> (Spondin 2)	-
<i>S100P</i> ( <i>S100</i> calcium-binding protein P)	-
<i>TACC3</i> (Transforming, acidic, coiled-coil-containing protein 3)	Crescimento e diferenciação celular.
<i>TNIP2</i> (TNFAIP3-interacting protein 2)	Envolvida na ativação da rota sinalização do MEK/ERK durante e resposta imune inata, atua na regulação da apoptose das células endoteliais.
<i>USP17</i> (Ubiquitin-specific protease 17)	-
<i>ZNF141</i> (Zinc finger protein 141)	Gene candidato para a síndrome de Wolf-Hirschhorn.
<i>WDR1</i> (WD repeat-containing protein 1)	-
<i>WFS1</i> ( <i>WFS1</i> gene)	Surdez autossômica dominante, Síndrome de Wolfram; Síndrome Wolfram-like, autossômica dominante; associação com Diabetes mellitus, não-dependente de insulina.
<i>WHSC1</i> ( <i>WHS</i> candidate 1 gene)	Regulação de fatores de transcrição de desenvolvimento cujos defeitos se sobrepõe à síndrome de Wolf-Hirschhorn.
<i>WHSC2</i> ( <i>WHS</i> candidate 2 gene)	Expresso em altos níveis em tecidos adultos e fetais. Participa da regulação da transcrição da RNA polimerase II. Gene candidato síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Continuação tabela 1.

**#14: 17p13.3-p13.1:87,309-7,306339**

<i>ACADVL (Acyl-CoA dehydrogenase, very long-chain)</i>	Deficiência de VLCAD ( <i>very long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i> ).
<i>AIPL1 (Arylhydrocarbon-interacting receptor protein-like 1)</i>	Distrofia Cone-rod, Leber amaurosis 4 congênita; retinite pigmentosa juvenil.
<i>ASPA (Aspartoacylase)</i>	Doença de Canavan.
<i>CHRNE (Cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide)</i>	Síndrome Miastênica.
<i>CTNS (Cystinosin)</i>	Cistinose.
<i>ENO3 (Enolase 3)</i>	Doença de armazenamento de glicogênio XIII.
<i>GP1BA (Glycoprotein IB, platelet, alpha polypeptide)</i>	Síndrome de Bernard-Soulier, tipo A1 e A2; Doença de Von Willebrand, tipo-plaqueta.
<i>PAFAH1B1 (Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit)</i>	Lisencefalia 1, síndrome de Miller-Dieker.
<i>PITPNM3 (Phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated, 3)</i>	Distrofia Cone-rod 5.
<i>PRPF8 (Precursor mRNA-processing factor 8, s. cerevisiae, homolog of)</i>	Retinite pigmentosa 13.
<i>P2RX1 (Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1)</i>	Doença hemorrágica.
<i>RILP (Rab-interacting lysosomal protein)</i>	-
<i>SERPINF2 (Serpin peptidase inhibitor, clade f, member 1)</i>	Osteogenesis imperfecta, tipo VI.
<i>SLC2A4 (Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 4)</i>	Diabetes mellitus não dependente de insulina.
<i>YWHAE (Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon isoform)</i>	Microdeleção del17p13.3.

**#16: 8p11.2: 39,258,894-39,386,158**

<i>ADAM3a (A disintegrin and metalloproteinase domain 2)</i>	-
--	---

**#17: 11p14.2-p14.1: 27,006,061-27,225,374**

<i>BBOX1 (Butyrobetaine-gamma,2-oxoglutarate dioxygenase 1)</i>	Catalisa a formação de <i>L-carnitine</i> para <i>gamma-butyrobetaine</i>
<i>FIBIN (Homo sapiens fin bud initiation factor homolog, zebrafish)</i>	-

**#22: 9q31.3-q32: 1,53: 113,919,284-115,449,137**

<i>ROD1 (Regulator of differentiation 1)</i>	-
<i>UGCG (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase)</i>	-

**#25: 9p13.3-p13.2:36,163,040-38,050,778**

<i>CLTA (Clathrin, light polypeptide a)</i>	Principal proteína do revestimento poliédrico de poços revestidos e vesículas.
<i>FBXO10 (F-box only protein 10)</i>	Componente substrato de reconhecimento do SCF (proteína <i>SKP1-CUL1-F-box</i> ) tipo E3 complexo ubiquitina ligase (por similaridade).
<i>GNE (UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/n-acetylmannosamine kinase)</i>	Miopatia corporal autossômica recessiva, Miopatia de Nonaka, Sialúria.
<i>GRHPR (Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase)</i>	Hiperoxalúria primária tipo II.
<i>MELK (Maternal embryonic leucine zipper kinase)</i>	Regulação do ciclo celular, auto-renovação das células-tronco, regulação da apoptose e splicing. Desempenha um papel essencial na proliferação celular e carcinogênese. Necessária para a proliferação de células progenitoras neurais multipotentes embrionárias e pós-natal.
<i>PAX5 (Paired box gene 5)</i>	Linfoma linfoplasmacitóide.
<i>RNF38 (Ring finger protein 38)</i>	-
<i>SBH (SBH adaptor protein)</i>	Regula vários sinais na cascata de transdução pela ligação a receptores ativados que diminuem a sinalização dos componentes.

**#30: 15q11.1-q11.2:20,575,646-22,486,999**

<i>BCL8 (B-cell CLL/lymphoma 8)</i>	Linfoma difundido em células grandes.
-------------------------------------	---------------------------------------

**#31:1q44: 20,575,646-22,486,999**

<i>OR13G1 (Olfactory receptor, family 13, subfamily G, member 1)</i>	Descriminação de odor.
--	------------------------

**#31: 6q22.31-q27:247,695,693-249,212,668**

<i>ALDH8A1 (Aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1)</i>	Biosíntese de 9-cis-retinol.
<i>CCR6 (Chemokine, CC motif, receptor 6)</i>	Atua no aumento do nível de íons de cálcio.
<i>CITED2 (CBP/p300-interacting transactivator, with glu/asp-rich C-terminal domain, 2)</i>	Defeito no septo atrial 8, defeito no septo ventricular 2.
<i>CTGF (Connective tissue growth factor)</i>	-
<i>C6orf59 (Chromosome 6 open reading frame 59)</i>	-
<i>FGFR10P (Fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner)</i>	Doença mieloproliferativa.
<i>GPR126 (G protein-coupled receptor 126)</i>	Receptor acoplado à proteína G indutor vascular.
<i>HBS1L (HBS1-like protein)</i>	Associado ao câncer pancreático.
<i>LPA (Apolipoprotein)</i>	Deficiência congênita de <i>LPA</i> , susceptibilidade à doença arterial coronária.

Continuação tabela 1.

<i>MAP3K5 (Mitogen-activated protein kinase kinase5)</i>	Regulação do sinal de quinase extracelular.
<i>MOXD1 (Monoxygenase)</i>	-
<i>NUP43(Nucleoporin 43KD)</i>	Adequada ligação dos microtúbulos no cinetócoro, progressão mitótica e segregação cromossômica.
<i>OLIG3 (Oligodendrocyte lineage transcription factor 3)</i>	Desenvolvimento dos neurônios classe A e B do corno dorsal do cordão espinhal.
<i>PKIB (Protein kinase, cAMP dependent catalytic, inhibitor beta)</i>	<i>PKIB</i> purificada é um inibidor competitivo AMPc dependente da proteína quinase.
<i>PTPRK (Protein-tyrosine phosphatase, receptor type)</i>	-
<i>RNF146 (Ring finger 146 protein)</i>	-
<i>RPS12 (Ribosomal protein S12)</i>	-
<i>SNX9 (Sorting nexin 9)</i>	Atua na Endocitose.
<i>STX7 (Sintaxin 7)</i>	Atua na organização da fusão dos endossomos e lisossomos com fagossomo.
<i>TFB1M (Transcription factor B1, mitochondrial)</i>	-
<i>TNFAIP3 (Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3)</i>	Resposta imune e inflamatória sinalizada por citocinas.
<i>UTRN (Utrophin)</i>	Codifica a utropina - proteína muscular.
<i>VNN1 (Vanin 1)</i>	Nível colesterol lipoproteína de alta densidade.
<i>VNN2 (Vanin 2)</i>	Ectoenzima com atividade panteteinase.
<b>#34: 22q11.23: 25,664,618-25,892,253</b>	
<i>CRYBB2P1 (Cristalin beta-B2)</i>	Catarata 3, múltiplos tipos.
<b>#37: 3q29: 197,574,293-197,766,791</b>	
<i>IQCG (IQ motif-containing protein G )</i>	-
<i>RPL35A (Ribosomal protein L35A )</i>	Anemia 5 Diamond-Blackfan .
<b>#38: 2p22.3: 25,664,618-25,892,253</b>	
<i>BIRC6 (Baculoviral IAP repeat-containing protein 6)</i>	-
<i>LTBP1 (Latent transforming growth factor-beta-binding protein 1)</i>	-
<b>#48: 10q26.3: 132,720,766-135,089,504</b>	
<i>ADAM8 (A disintegrin and metalloproteinase domain 8)</i>	-
<i>DPYSL4(Dihydropyrimidinase-like4)</i>	Atua na orientação do axônio, crescimento neuronal e migração celular.
<i>GPRI23 (G protein-coupled receptor 123)</i>	-
<i>INPP5A (Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40-KD)</i>	Principal isoenzima que hidrolisa o segundo mensageiro mobilizador de cálcio.
<i>UTF1 (Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1)</i>	Atua como um coativador transcripcional do ATF2.

\*OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man* – Herança Mendeliana; “-“, não especificado; MERK: proteína ativada por mitógeno quinase; ERK: sinal extracelular regulador de quinase; AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina; ATF2: ativador do fator de transcrição 2.

**CAPÍTULO 5**  
**DISCUSSÃO**

---

O objetivo deste estudo foi de identificar, retrospectivamente, desequilíbrios genômicos através da Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (*array-CGH*), em amostras de DNA de neonatos com anomalias congênicas de etiologia desconhecida, armazenadas em biorrepositório. Além disso, este estudo visou a avaliar a contribuição do *array-CGH* como uma ferramenta diagnóstica de primeira linha em recém-nascidos com anomalias congênicas, avaliados por um programa de monitoramento de defeitos congênicos em uma maternidade pública do sul do Brasil.

O uso de tecnologia baseada em *microarrays* tem permitido detectar desequilíbrios patogênicos em aproximadamente 14-18% dos casos com atraso no desenvolvimento, déficit intelectual e/ou anomalias congênicas múltiplas, referidos para análise (Hochstenbach *et al.*, 2011). Apesar de existir uma clara associação entre CNVs e anomalias congênicas, tanto sindrômicas quanto não sindrômicas, apenas poucos estudos de coorte em larga escala foram realizados com a utilização de análise do genoma por *array-CGH* em amostras de neonatos com defeitos congênicos.

Lu *et al.* (2008) relataram a frequência de desequilíbrios genômicos em 638 neonatos com diversos defeitos congênicos variados referidos para análise cromossômica por *microarrays*. Os autores usaram três diferentes plataformas de *microarrays* com cobertura progressivamente maior e compararam os resultados obtidos. No conjunto, 17.1% dos pacientes foram identificados com anormalidades clinicamente significantes, com taxa de detecção de 13,7%, 16,6% e 19,9%, dependendo da resolução da plataforma utilizada. Quando considerados todos os desequilíbrios encontrados em cada uma das três plataformas, estes números aumentaram para 22,8%, 28% e 28,9%, respectivamente. Estes resultados evidenciam que, quanto maior a cobertura genômica do *microarray* utilizado, maior o número de desequilíbrios identificados ao longo do genoma e, conseqüentemente, maior a possibilidade de alterações patogênicas serem identificadas.

Até o momento, o estudo mais abrangente de triagem neonatal (realizado em 20.126 casos não selecionados) com a utilização de análise por *array-CGH* como teste de primeira linha revelou que 87/20.126 (0.43%) dos recém-nascidos apresentavam desequilíbrios cromossômicos (53 casos de aneuploidias, 23 de deleções e 11 de duplicações) (Park *et al.*, 2013). Reddy *et al.* (2012) relataram os resultados de um estudo populacional em 532 natimortos. Nessas amostras, a análise por *array-CGH* evidenciou mais alterações do que a análise pelo cariótipo (87,4% vs 70,5%), permitiu detecção mais precisa das alterações genéticas (aneuploidias ou CNVs patogênicas,

8,3% vs 5,8%) e também permitiu identificar um maior número de desequilíbrios genômicos entre os 67 natimortos com anomalias congênitas (29,9% vs 19,4%).

No presente estudo a análise citogenômica através de *array-CGH* de amostras de recém-nascidos com malformações congênitas de etiologia desconhecida levou à identificação de alterações genômicas em 12/35 (34.3%) das amostras de DNA. Neste estudo, os resultados de uma análise cromossômica prévia estavam disponíveis em 32 casos, mostrando que a frequência de desequilíbrios cromossômicos detectada pelo cariótipo convencional havia sido de 1/32 (3.1%). A taxa de anomalias cromossômicas aumentou para 9/32 casos (28%) com o uso de *array-CGH*, confirmando a maior sensibilidade desse método.

Em 4/35 (11,4%) casos, as CNVs puderam ser definidas como patogênicas e causalmente relacionadas com os fenótipos anormais. Diferenças de taxas entre diversos estudos podem estar relacionadas ao tamanho da coorte, aos critérios de seleção de pacientes, à plataforma de *microarrays* utilizada e à interpretação da relevância clínica das CNVs. Entre esses, em dois casos (31 e 48) as anormalidades encontradas não haviam sido previamente associadas com síndromes reconhecidas. Em dois outros casos (1 e 4) as alterações patogênicas já haviam sido associadas à síndromes de microdeleção bem definidas (síndrome de Wolf-Hirschhorn, SWH, e síndrome de Miller-Dieker, SMD, respectivamente).

Nesses dois últimos casos, os desequilíbrios genômicos poderiam ter sido previamente diagnosticados pelo cariótipo e/ou pela análise com FISH isoladamente (usando sondas *loci*-específicas para a região cromossômica crítica) caso os achados clínicos na época tivessem sido indicativos de uma síndrome de microdeleção particular, para informar exatamente qual região e/ou cromossomo deveria ser investigado pelo método de FISH. Neste estudo, ambas as amostras eram de indivíduos nos quais os resultados nem do cariótipo, nem da análise por FISH estavam disponíveis. Entretanto, mesmo que uma microdeleção seja detectada por cariótipo ou FISH, a reavaliação através de *array-CGH* leva a uma melhor caracterização dos segmentos cromossômicos envolvidos quanto ao tamanho da alteração e a uma resolução precisa dos pontos de quebra do rearranjo cromossômico. Isto permite uma melhor correlação genótipo-fenótipo em síndromes definidas e/ou a determinação de genes candidatos associados à novas síndromes.

Certas doenças gênicas, como SWH e SMD, são síndromes de microdeleção com rearranjos não recorrentes de tamanho variáveis. A síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH, OMIM 194190) possui uma frequência estimada de 1/50.000 nascidos vivos, (Battaglia *et al.*, 2008) e na grande maioria dos casos, resulta de uma perda ou deleção de parte do material do braço curto do cromossomo 4 na região 16.3. Duas regiões críticas foram descritas associadas à patogênese da SWH: região crítica 1 (*WHSCR1*) consiste em um intervalo de 165kb, 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 e inclui o gene *LETM1* (OMIM 604407). Aparentemente, deleções terminais *de novo* envolvendo a região crítica são a causa mais frequente da WHS, ocorrendo em 55-75% dos portadores (Zollino *et al.*, 2008). 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 *et al.*, 2009). A mortalidade de indivíduos afetados pela SWH nos dois primeiros anos de vida chega a 21% (Shannon *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, o caso em que a deleção 4p16.3 foi detectada foi à óbito 35 dias após o nascimento, sem um diagnóstico definido e sem que a suspeita clínica de SWH tivesse sido levantada. Nele identificamos, posteriormente, a deleção mais frequente associada à SWH, envolvendo a deleção do gene *WHSC1*. 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 sequências flanqueadoras à *WHSCR*, levariam a uma modificação da expressão do gene em alguns casos, explicando a variabilidade fenotípica dos indivíduos.

A síndrome de Miller-Dieker (SMD, OMIM #247200 / Lisencefalia, *LIS1*, OMIM #607432) é uma síndrome de genes contíguos caracterizada por lisencefalia (“cérebro liso”), uma malformação cerebral que resulta de um distúrbio na migração neuronal no período de 9 a 13 semanas de gestação. 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* tipo 1 ou Lisencefalia clássica) (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 (Enomoto *et al.*, 2012). No caso de del17p13.3 identificado neste estudo, ambas as deleções em *YWHAE* e *PAFAH1B1* estavam presentes.

Em um dos dois casos com *artrogripose multiplex congênita* (caso 31) uma duplicação de 49.75 Mb no braço longo do cromossomo 6, nas bandas q22.31-q27, e uma deleção de 1.52 Mb no braço longo do cromossomo 1, na banda q44, foram identificadas. Uma pesquisa nos registros de laboratório mostrou que um cromossomo derivado de origem não determinada envolvendo o braço longo do cromossomo 6 já havia sido previamente relatada no cariótipo, mas que o desequilíbrio envolvendo o cromossomo 1 não havia sido ainda identificado. Na época, havia a expectativa de que o cariótipo dos pais seria realizado para melhor definir o tipo e a origem (se *de novo* ou familiar) do material adicional no cromossomo 6. Neste caso, fica evidente já a partir da análise do cariótipo que uma duplicação cromossômica grande deva envolver muitos genes, que estariam causalmente relacionados com as anomalias congênitas, como foi assumido para o caso 31. Entretanto, a análise por *array-CGH* permitiu informações genômicas adicionais e a definição em relação à duplicação intersticial na região 6 q22.31-q27 de 12.9 Mb e a detecção de um novo desequilíbrio cromossômico adicional (deleção 1q44 de 1.5 Mb), que não havia sido relatado neste caso anteriormente. Não é raro que mais de uma CNV seja identificada em um mesmo indivíduo. Cabe ressaltar que já foi reconhecido que a presença de uma outra CNV no mesmo indivíduo pode reduzir ou agravar o fenótipo clínico (Girirajan *et al.*, 2012; Girirajan *et al.*, 2013).

Das 2 amostras com fenda labial e/ou palatina sindrômica (casos 14 e 34) e das 3 amostras com fenda labial e/ou palatina não-sindrômica (casos 25, 30 e 37), em 1 caso (14) foi detectada uma deleção de 7.2 Mb clinicamente significante no cromossomo 17p13.3-p13.1, a qual coincide com a região reconhecida para a deleção relacionada com a SMD. Em 4 outros casos, CNVs benignas (casos 30 e 34) ou VOUS foram identificadas (casos 25 e 37). Aproximadamente 30% dos casos de fenda lábio-palatina e 50% dos casos de fenda palatina integram síndromes de anomalias congênitas múltiplas (Stanier *et al.*, 2004). Tanto fatores genéticos quanto ambientais são conhecidos por contribuir para a ocorrência de fendas labiais e/ou palatinas, tornando complicada a elucidação dos mecanismos patogênicos. Esforços consideráveis têm sido feitos na busca de gene candidatos para fendas não-sindrômicas através de *array-CGH*, mostrando ser este um método efetivo para isolar *loci* candidatos (Osoegawa *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2009).

A relevância clínica de 5/13 (38,5%) CNVs entre os 12 casos com desequilíbrios genômicos permanece indefinida (variação de significado incerto; *VOUS*) até o momento, uma vez que as evidências são insuficientes para se concluir se as CNVs são patogênicas ou benignas. Mesmo para as CNVs nos quais não há um registro robusto sobre a sua relevância clínica, a interpretação sobre o quanto estão causalmente relacionados com o defeito congênito pode ser desafiadora. Devemos ainda considerar que a CNV possa ser potencialmente herdada de um progenitor sadio, podendo ser nesse caso uma variante patogênica com penetrância incompleta, ou uma variante familiar benigna.

A natureza altamente variável do genoma indica que cuidados devem ser tomados ao avaliar a patogenicidade potencial de CNVs detectadas por *array-CGH*. Nas CNVs classificadas neste estudo como *VOUS*, espera-se que estudos parentais sejam realizados para permitir uma melhor interpretação dos resultados e para trazer informações valiosas para o aconselhamento genético antes de uma nova gestação. Ressaltamos que é importante registrar dados sobre desequilíbrios cromossômicos com significado clínico duvidoso, pois alguns deles podem indicar CNVs recorrentes associadas à novas síndromes. Relatos de pacientes com rearranjos cromossômicos e achados clínicos similares podem levar à identificação de novas síndromes genéticas ou de genes candidatos associados à anomalias congênitas isoladas.

Em quatro casos (16, 30, 34 e 38), variantes normais, classificadas como benignas, foram detectadas. É reconhecido que todos os humanos diferem nos seus cromossomos ao nível submicroscópico e que as CNVs ocorrem com alta frequência, como polimorfismos de número de cópias presentes em > 5% da população (Iafate *et al.*, 2004; Redon *et al.*, 2006). Esses polimorfismos de número de cópias são, mais frequentemente, relativamente pequenos, podem ser herdados de um progenitor fenotipicamente normal, estão preferencialmente presentes em regiões com poucos genes e usualmente contém mais sequências repetitivas de DNA. Está estimado que cerca de 12% da eucromatina possa variar sem que ocorra um efeito fenotípico. Uma porção adicional de cerca de 20% do genoma consiste de heterocromatina extremamente variável, concentrada ao redor de regiões centroméricas e teloméricas que contém poucos genes (Liehr *et al.*, 2014). A presença de CNVs foi registrada neste estudo mesmo quando presente em regiões que, consistentemente, abrigam variantes benignas, uma vez que o conhecimento mais consistente sobre isso pode vir a reduzir a

necessidade de realizar estudos dos progenitores de neonatos nos quais CNVs comprovadamente benignas foram identificados.

Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de distinguir desequilíbrios *de novo* dos desequilíbrios herdados devido à indisponibilidade de DNA dos progenitores que pudesse ser analisado. CNVs *de novo* em regiões clinicamente significantes são mais prováveis de serem causadoras de patologia. No entanto, CNVs patogênicas herdadas não podem ser excluídas como causa de anomalias congênitas em função da sua expressividade variável e penetrância incompleta (Kearney *et al.*, 2011; Riggs *et al.*, 2012) CNVs patogênicas podem ser herdadas de um progenitor aparentemente normal e contribuir para um fenótipo anormal na criança. Esses tipos de CNVs podem representar *loci* de susceptibilidade, uma vez que eles aumentam a chance da criança desenvolver anomalias congênitas, mas podem não ser suficientes para causar alterações fenotípicas por elas mesmas.

Estudos em progenitores devem ser recomendados para indivíduos nos quais achados clinicamente significantes foram relatados, para determinar se as CNVs representam eventos *de novo* ou familiares. Ainda que várias estratégias tenham sido propostas para ajudar a interpretar o significado dos desequilíbrios genômicos, não existem ainda critérios que sejam universalmente aceitos. É essencial ter a informação mais precisa e atualizada possível sobre o significado clínico dos desequilíbrios cromossômicos detectados, assim como sobre CNVs em diferentes regiões do genoma, sobre mutações patogênicas ou polimorfismos em outros genes e sobre fatores não genéticos que podem ser necessários para que uma anomalia congênita se expresse. Cuidados devem ser tomados no processo de interpretação clínica de um resultado de *array-CGH*. Consultas adicionais ao geneticista clínico e uma análise de familiares adicionais podem ser necessárias para que se possa prover um aconselhamento genético preciso às famílias.

Uma característica usual dos estudos retrospectivos é muitas vezes a escassa informação clínica relacionada aos casos. Neste estudo, a informação clínica obtida, foi a que estava disponível nos registros hospitalares no período da referência inicial da investigação genética dos neonatos. A maioria deles foi registrada no momento das solicitações iniciais de exames e, dessa forma, eram relativamente pouco detalhadas. Mesmo assim, consideramos que esta coorte é representativa dos neonatos com anomalias congênitas nos quais havia uma suspeita clínica da presença de um desequilíbrio cromossômico. É digno de nota que 6/35 (17%) dos recém-nascidos com

anomalias congênitas vieram a falecer logo após o nascimento. Fica evidente a importância dos dados da necropsia pós-natal que, além de auxiliar na caracterização do quadro clínico dos casos que evoluem para o óbito, são fundamentais para um diagnóstico acurado e para um melhor estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo.

Entre as vantagens da análise citogenômica com o método de *array-CGH*, estão a de não ser necessária a obtenção de cromossomos metafásicos e a maior sensibilidade, uma vez que é capaz de detectar em amostras de DNA, qualquer rearranjo cromossômico em desequilíbrio e genes candidatos para diversas condições. Neste estudo, em três casos não havia registro de realização de análise cromossômica anterior. Em dois destes (1 e 14), a detecção de rearranjos cromossômicos foi possível posteriormente por haver amostras de DNA armazenadas. O presente estudo demonstrou a exequibilidade e a utilidade do *array-CGH* na identificação de deleções e duplicações em amostras de DNA estocadas em biorrepositório. Foi demonstrado que uma proporção dos recém-nascidos com anomalias congênitas de causa desconhecida apresenta desequilíbrios cromossômicos relacionados com os seus fenótipos.

A maior desvantagem da utilização de *array-CGH* é a de não detectar rearranjos cromossômicos equilibrados, como as translocações balanceadas. Além disso, no Brasil, o alto custo e a escassez de centros especializados e de profissionais habilitados em citogenômica, são motivos que dificultam sua utilização a investigação em programas de triagem neonatal seletiva.

Este estudo permitiu a detecção de anormalidades cromossômicas consistentes com síndromes genéticas em uma idade precoce, quando os achados clínicos podem ser ainda pouco definidos. Além disso, mesmo em síndromes bem definidas clinicamente, rearranjos cromossômicos recorrentes e não recorrentes com alta variabilidade em seu tamanho ocorrem, levando a um amplo espectro fenotípico nos indivíduos afetados, por vezes fora dos limites de detecção clínica.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a técnica de *array-CGH* foi padronizada com sucesso em um hospital público do Sistema Único de Saúde (SUS), estando em condições de ser aplicada no rastreamento genômico seletivo de neonatos com anomalias congênitas de causa desconhecida avaliados por um Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos, permitindo a identificação e caracterização de rearranjos cromossômicos relacionados às malformações congênitas.

Estudos retrospectivos ou prospectivos utilizando *array-CGH* em casos de defeitos congênitos cuja causa não foi esclarecida podem beneficiar as famílias afetadas

por permitir, em uma proporção significativa dos casos, uma elucidação diagnóstica mais precisa. Acredita-se que os dados obtidos por meio deste trabalho contribuam para uma melhor caracterização genotípica em neonatos portadores de anomalias congênitas. Nossos achados reforçam que uso de *array-CGH* como uma ferramenta diagnóstica de primeira linha pode proporcionar um diagnóstico acurado e impactar favoravelmente o manejo global dos casos desde o período neonatal.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

Albertson DG and Pinkel D (2003) Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12:145–52.

Battaglia A, Filippi T and Carey JC (2008) Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) Syndrome: Experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 148C:246-251.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FNS (2011) Manual de Instruções para o Preenchimento da Declaração de Nascido Vivo. 4ª edição. Ministério da Saúde, Brasília, 29 pp. [cited 2013 Dec 10] Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Brasil. Portal da Saúde- SUS. Sistema de informação sobre mortalidade (SIM) [cited 2013 Dec 10] Available from: <http://www.svs.aids.gov.br>

Brasil. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS [cited 2013 Dec 10] Available from: <http://www.datasus.gov.br>

Caluseriu O and Reardon W (2012) Malformation syndromes. In: *Rennie JM. Rennie & Robertson's textbook of Neonatology. 5th edition. Churchill Livingstone Elsevier, London, pp 792-814.*

Calvo AS, Roselló-Sastre E, Puig BM, Chancosa RB, Ebri MLP, Barrachina IA, Camarasa LN, Bermejo-Sánchez E and Escandón AJ (2012) Defectos congénitos en recién nacidos y fetos procedentes de interrupción del embarazo tras diagnóstico prenatal en el período 1982-2009. *Med Clin* 141:152-158.

Castilla EE and Orioli IM (2004) ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet* 7:76–94.

Chromosomal Variation in Man Online Database [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://www.wiley.com/legacy/products/subject/life/borgaonkar/access.html>

The Chromosome Anomaly Collection [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://www.ngri.org.uk/wessex/collection/>

Cytogenetic Data Analysis System (CyDAS) [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://www.cydias.org/>

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources (Decipher) [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk/>

Database of genomic structural variation (bdVar) [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>

Database of Genomic Variants (DGV) [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://projects.tcag.ca/variation>

de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, Kuhn RM, Ledbetter DH, Martin CL, van Ravenswaaij CMA, *et al.* (2012) Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat* 33:930-940.

De Rijk-van Andel JF, Catsman-Berrevoets CE, Halley DJJ, Wesby-Van Swaay E, Niermeijer MF and Oostra BA (1991) Isolated lissencephaly sequence associated with a microdeletion at chromosome 17p13. *Hum Genet* 87:509-510.

ECLAMC (2007) Manual Operacional. Rio de Janeiro, 92 pp.

Engbers H, van der Smagt JJ, van't Slot R, Vermeesch JR, Hochstenbach R and Poot M (2009) 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.

Enomoto K, Kishitani Y, Tominaga M, Ishikawa A, Furuya N, Aida N, Masuno M, Yamada KI and Kurosawa K (2012). 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:2347-2352.

Ensembl Genome Browser [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://www.ensembl.org/>

European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>

Feuk L, Carson AR and Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet* 7:85–97.

Gijsbers AC, Schoumans J and Ruivenkamp CA (2011) Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res* 135:222-227.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, *et al.* (2010) A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* 42:203-209.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipin RA, McConnel JS, Angle B, Meschino WS, *et al.* (2012) Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 367:1321-1331.

Girirajan S (2013) Genomic disorders: complexity at multiple levels. *Genome Med* 5:43.

Gu W, Zhang F and Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics* 1:17.

Guerra F, Llerena JJ, Gama S, Cunha C and Theme Filha M (2008) Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). *Cad Saude Publica* 24:140-149.

Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, Vries BBA, Ponting CP and Veltman JA (2010) Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *PLoS Comput Biol* 6:e1000752.

Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA and Ophoff RA (2011) Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* 135:174-202.

Horovitz D, Llerena Jr. J and Mattos R (2005) Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad Saúde Pública* 21:1055-1064.

Horovitz DD, de Faria Ferraz VE, Dain S and Marques-de-Faria AP (2013) Genetic services and testing in Brazil. *J Community Genet* 4:355-375.

Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Sherer SW and Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951.

The International Collaboration for Clinical Genomics (ICCG) [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://www.iccg.org/>

Jackson L (2002) Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol* 45:622-639.

Jacobs P, Browne C, Gregson N, Joyce C and White H (1992) Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29:103-108.

Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F and Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.

Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A and Rao KW (2011) Working Group of the American College of Medical Genetics. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med* 13:676-679.

Korteweg FJ, Bouman K, Erwich JJHM, Nijman TH, Timmer A, Veeger NJGM and Holm JP (2008) Cytogenetic Analysis After Evaluation of 750. *Obstet Gynecol* 111: 865–874.

Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T and Rival JM (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121-128.

Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235–1247.

Lee C and Scherer SW (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* 12:e8.

Leite JCL, Stein NR, Troviscal LP and Giugliani R (2001) Programa de monitoramento de defeitos congênitos: experiência do estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas no HCPA. *Rev HCPA* 3:293-300.

Le Scouarnec S and Gribble SM (2012) Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity* 108:75-85.

Liehr T (2014) Benign & Pathological Chromosomal Imbalances. Microscopic and Submicroscopic Copy Number Variations (CNVs) in Genetics and Counseling. Elsevier, London, 232 pp.

Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, *et al.* (1996) Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet* 14:312-315.

Lu X, Phung MT, Shaw C, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino C, Stankiewicz P, Kang SL, *et al.* (2008) Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122:1310–1318.

Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangement and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-422.

Maluf SW, Riegel M, *et al.* (2011) *Citogenética Humana*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 336 pp.

McDonnell SK, Riska SM, Klee EW, Thorland EC, Kay NE, Thibodeau SN, Parker AS and Eckel-Passow JE (2013) Experimental designs for array comparative genomic hybridization technology. *Cytogenet Genome Res* 139:250-257.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, *et al.* (2010) Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749–764.

Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK, *et al.*, 1000 Genomes Project (2011) Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470:59-65.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nazer J and Cifuentes L (2011) Malformaciones congénitas en Chile y Latino América: Una visión epidemiológica del ECLAMC del período 1995-2008. *Rev Med Chile* 139: 72-78.

Nelson K and Holmes L (1989) Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. *N Engl J Med* 20:19-23.

Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, L'Heureux J, Pfundt R, Staaf J, van der Vliet WA, *et al.* (2008) Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *Vis J Med Genet* 45:81.

Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Chung HD and Kang HY (2013) The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns. *Mol Cytogenet* 6:1-5.

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

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, *et al.* (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207–211.

Poletta FA, Gili JA and Castilla EE (2014) Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC): A Model for Health Collaborative Studies. *Public Health Genomics* 1431:7.

Reddy UM, Page GP, Saade GR, Silver RM, Thorsten VR, Parker CB, Pinar H, Willinger M, Stoll BJ, Heim-Hall J, *et al.* (2012) Karyotype versus Microarray Testing for Genetic Abnormalities after Stillbirth. *N Engl J Med* 367:2185-2193.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen WW, *et al.* (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 23:444-454.

Riegel M (2014) Human Molecular Cytogenetics: From Cells to Nucleotides. *Genet Mol Biol. In press.*

Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM, Wain KE, Williams ES, Aradhya S, Kearney HM, *et al.* (2012) Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet* 81:403-412.

São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênicas (2012) 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.

Schinzel A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. (2001) 2nd edition. Walter de Gruyter Press, Berlin, 966 pp.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Manér S, Massa H, Walker M, Chi M, *et al.* (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528.

Shaikh T (2007) Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med* 9:617-625.

Shannon NL, Maltby EL, Rigby AS and Quarrell WJ (2001) An epidemiological study of Wolf-Hirschhorn syndrome: life expectancy and cause of mortality. *J Med Genet* 38:674–679.

Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie TR, Wiicox AJ and Murray JC (2009) Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 15:42–51.

Small supernumerary marker chromosomes [cited 2014 Jan 26] Available from: <http://ssmc-tl.com/sSMC.html>

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T and Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399–407.

Stanier P and Moore GE (2004) Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 13(Spec No 1):R73–81.

Stankiewicz P and Lupski JR (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 61:437-455.

Telenius H, Carter N, Bebb C, Nordenskjöld M, Ponder B and Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725.

Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Alberton D, Pinkel D, *et al.* (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37:727-732.

Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, *et al.* (1999) Multiplex-FISH (M-FISH) for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65:448–462.

The United Nations Children's Fund (UNICEF) [cited 2014 Feb 28] Available from: <http://www.unicef.org>

The United Nations Children's Fund (UNICEF) Levels & Trends in Child Mortality- Report 2013 [cited 2014 Feb 28] Available from: <http://www.childinfo.org/mortality.html>

University California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser, 2002 [cited 2014 Feb 23] Available from: <http://genome.ucsc.edu/>

Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K and Hastings RJ (2012) Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Human Mutation* 33: 906–915.

Victoria CG, Aquino EM, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC and Szwarcwald CL (2011) Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet* 377:1863-1876.

Vissers LE and Stankiewicz P (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. In: Lars Feuk (ed). *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 838, Springer Science+Business Media, LLC, pp 29-75.

World Health Organization (WHO) [cited 2014 Feb 27] Available from: <http://www.who.int/en/>

Zollino M, Murdolo M, Marangi G, Pecile Z, Galasso C, Marzzanti L and Neri G (2008) On Nosology and Pathogenesis of Wolf-Hirschhorn Syndrome: Genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 148C:257-269.

## **ANEXOS**

---

Anexo 1 – Ficha de Registro Clínico do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos/ECLAMC do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

NOME=		<b>E C L A M C</b>	
RESIDÊNCIA=rua _____ bairro= _____		HOSPITAL _____ DIA _____ MÊS _____ ANO _____	
telefone: _____ Município: este _____ outro= _____		Nº Pront. _____ Dr. _____	
Mallormado _____ Controle seguinte _____ Controle não seguinte DE _____		PESO= _____ g GESTA _____	
M A L F O R M A Ç Õ E S		PIG AIG GIG IDADE GESTAC _____ semanas	
		NASCIDO vivo morto aborto	
		SEXO masc femin intersexo	
		ALTA vivo morto sem alta Idade _____ dias	
		APRESEN cefal podal outra	
		PARTO espon vacuum lorcp cesárea	
		GEMELAR não sim: _____	
		EVIDÊNCIAS IRMAO GÊMEO NÃO MALFORMADO	
		Clínica ORDEM 1º 2º outra	
		Radiológica NASCIDO vivo morto ou AE	
Cirurgica ALTA vivo morto NE			
Autópsia SEXO masc femi NE			
US.Pré-natal APRES cefal podal outra			
US.Pós-natal PARTO esp vac forc cesar			
Ecocardi PESO= _____			
Citogenet _____			
IDADE DE DIAGNÓSTICO DEIXE EM BRANCO			
PRÉ-NATAL NATAL (1º dia) 1 4 SR			
PÓS-NATAL: _____ 2 A SM			
Marcar: (Dias) (Meses) (Anos) 3 F SO			
CONSULTAS PRÉ-NATAIS Não Sim		ÚLTIMA MENSTRUACÃO dia _____ mês _____ ano _____	
NÚMERO _____ De: _____ a: _____ semanas		PLACENTA : PESO _____ An: _____	
LUGAR _____ Aqui _____ Outro: _____		GRUPOS SANGÜÍNEOS _____ CORDÃO _____ Nº _____	
US _____ Não _____ Sim _____ Data 1º US _____ / _____ / _____ Nº total de US: _____		0+ 0- A+ A- B+ B- AB+ AB-	
OUTROS (Especificar): _____		RN _____ cm.Compr. _____	
RESULTADOS: _____		Vasos _____	
DEIXE EM BRANCO SF Não Sim		Circulares _____	
		Nós _____	
ANTECEDENTES DA GRAVIDEZ		P R E TRIMESTRE	
NÃO SIM ESPECIFICAÇÕES		1 2 3	
IMUNIZAÇÕES			
SINAIS E SINTOMAS			
DOENÇAS AGUDAS		1 _____	
		2 _____	
DOENÇAS CRÔNICAS			
FATORES FÍSICOS			
MEDICAMENTOS		1 _____	
Um por linha.		2 _____	
Nome, via, dose, duração		3 _____	
		4 _____	
METRORRAGIA			
FUMA		Nº médio de cigarros diários _____	
BEBE		SE EMBRIAGOU nunca ocasional frequentemente	
		ALCOLISMO SEVERO não sim	
DROGA: cocaína, etc		-// // // //	
SÃO TODOS FILHOS DO MESMO PAI?		SIM NÃO= Especifique com ▽ no quadro	
Gestação		DATA DE INÍCIO DE CONVIVÊNCIA	
Produto NV NM AE		dia/mês/ano _____ / _____ / _____	
Sexo M F I		CONCEBE FÁCIL SIM NÃO=	
Dia de nascimento		FEZ ESTUDOS FEZ TRATAMENTOS	
Mês de nascimento		ESCOLARIDADE OCUPAÇÃO	
Ano de nascimento		MAE PAI MAE PAI	
Idade _____ Sobrenome _____		Localidade _____ Estado _____ País _____	
Lugar de Nascimento		País Nas. _____	
MAE		Avós _____ Avós _____	
PAI		NAO: Não lê Do lar	
MALFORMADOS NA FAMÍLIA SIM NÃO		NAO: Sim lê Desocupado	
SIM NÃO CONSANGUINIDADE PARENTAL SIM NÃO		Prim.Incomp Opç.não qualif	
		Prim.Comp Opç.qualificado	
		Secund.Inco Opç.independ	
		Secund.Com Empregado	
		Univ.Incomp Patrão	
		Univ.Comp Prof./Execut	
		ATIVIDADE OCUPACIONAL DA MAE	
		Trabalha fora? não sim: Especificar= _____	
		ANTEPASSADOS	
		Europeus latinos Turcos	
		Europ. não latinos Negros	
		Judeus Orientais	
		Nativos Outros *	

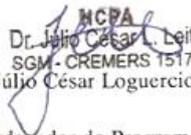
Anexo 2 – Autorização do coordenador do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos do HCPA para utilização de material biológico



Porto Alegre, 15 de junho de 2013.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Comissão do Programa de Monitoramento de Defeitos Congenitos (Programa de Ação de Extensao UFRGS 20274 – processo 23078.001517/2012-71) vinculado ao Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congenitas (ECLAMC) autoriza a utilização de material biológico para o estudo **“PESQUISA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS SUBMICROSCÓPICOS ASSOCIADOS A MALFORMAÇÕES CONGENITAS”** sob a responsabilidade da Dra. Mariluce Riegel. Desde que seja garantido o cumprimento das normas operacionais do programa PMDC e a utilização do material biológico de forma anônima e sem identificação.

  
HCPA  
Dr. Julio César Loguercio Leite  
SGM - CREMERS 15170  
Dr. Julio César Loguercio Leite

Coordenador do Programa de Monitoramento de Defeitos Congenitos

### Anexo 3 - Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico



**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

**PESQUISA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS SUBMICROSCÓPICOS  
ASSOCIADOS A MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS**

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, 15 de junho de 2013.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Luiza Emy Dorfman	
Júlio César Loguercio Leite	
Mariluce Riegel	

Anexo 4 - Resumo das indicações clínicas associadas às 35 amostras incluídas no estudo no período referido para análise cromossômica convencional

Caso	Sexo	Idade materna*	Cariótipo	Resumo das indicações clínicas
1†	F	33	ND	HDC, microtia, hipertelorismo, cardiopatia congênita (dextrocardia), atresia anal
2	M	ND	ND	CC (Tetralogia de Fallot)
4	M	ND	46,XY	Onfalocele, microcefalia
5	M	23	46,XX	Onfalocele, agenesia de membros superiores, genitália ambígua, atresia anal, disfunção de bexiga
10	F	20	46,XX	Gastrosquise
12†	M	16	46,XY	HDC
13	M	20	46,XX	Focomelia unilateral, displasia de quadril
14	M	29	ND	Assimetria cranial, fissura de palato mole, hipertelorismo ocular, atresia de esôfago tipo IIIB, camptodactilia, clinodactilia do quinto dedo, pé torto congênito
15	M	28	46,XY	Atresia anal, pé torto congênito
16	F	32	46,XX	Atresia anal, hipoplasia genital, CC
17	F	21	46,XX	AMC (amioplasia), pé torto congênito
19	F	30	46,XX	FL à esquerda + FP não síndrômica
22†	F	22	46,XX	Microcefalia, hipoplasia cerebelar, oligodrâmnio, hipoplasia pulmonar, displasia renal, hipoplasia genital, microgiria frontal, encefalocele occipital, hipoplasia cerebelar
23	F	20	46,XX	Onfalocele, microcefalia
24	M	31	46,XY	Micrognatia, incisivo central superior único
25	F	22	46,XX	FL+P bilateral não síndrômica
29	M	SR	46,XY	CC (Tetralogia de Fallot)
30	M	21	46,XY	FL+P bilateral não síndrômica
31†	M	18	46,XY,der(6)	Artrogripose múltipla congênita (amioplasia), CC (Tetralogia de Fallot), displasia de quadril
32†	F	19	46,XX	Displasia renal multicística bilateral, oligodrâmnio
33	M	s/r	46,XY	FP, pé torto congênito
34	M	17	46,XY	FL à esquerda, FP, cabelos implantados na fronte em formato de “bico de viúva”, hipertelorismo mamilar, hipoplasia genital, hipospádia
35	F	ND	46,XX	HPE, oligodrâmnio, microcefalia, atresia de coana unilateral
36	M	41	46,XY	FL não síndrômica
37	M	24	46,XY	FL+P bilateral não síndrômica
38	M	30	46,XY	Atresia esofágica tipo IIIB
40	M	28	46,XY	RCIU
41†	F	24	46,XX	Gastrosquise
42	F	21	46,XX	CC (Tetralogia de Fallot)
43	M	22	46,XY	FL não síndrômica
44	M	30	46,XY	Microlisencefalia, micrognatia
47	F	17	46,XX	Gastrosquise
48†	M	25	46,XY	Displasia renal multicística bilateral, oligodrâmnio, hipoplasia pulmonar bilateral
49	F	24	46,XX	Gastrosquise
50	M	SR	46,XY	AMC, micrognatia.

†= óbito; \*= idade materna ao nascimento em anos; der=derivado, ND=não disponível,

AMC = Artrogripose Múltipla Congênita, CC = Cardiopatia Congênita, FL = Fissura labial, FP = Fissura palatina, FL+P = Fissura lábio-palatina, HDC = Hérnia Diafragmática Congênita, , RCIU= Restrição de Crescimento Intrauterino

## Anexo 5: GLOSSÁRIO

**Agenesia:** falência na formação de um órgão, geralmente decorrente de aplasia.

**Amioplastia:** tipo mais comum de artrogripose membros superiores e inferiores bilateralmente afetados, ocorre a troca de músculo esquelético por tecido fibroso denso e adiposo.

**Anomalia:** fora do normal, da norma, do usual, sem qualquer conotação etiopatogênica.

**Aplasia:** ausência de tecido, podendo resultar na ausência de algum órgão ou característica morfológica.

**Artrogripose:** contraturas congênicas não progressivas em duas ou mais áreas do corpo.

**Atresia anal:** ausência de continuidade do canal anorretal ou da comunicação entre o reto e ânus, ou estreitamento do canal anal.

**Bico de viúva:** prolongamento do escalpo capilar, em forma de cunha, sobre a testa na linha média.

**Camptodactilia:** flexão na interfalange proximal, podendo acometer qualquer dedo, porém mais comum no dedo mínimo.

**Clinodactilia:** encurvamento lateral de dedo, em geral em direção à linha média, no plano da palma.

**Congênito:** presente ao nascimento, ainda que não necessariamente diagnosticado.

**Defeito congênito:** defeitos presentes ao nascimento podem ser estruturais, funcionais, bioquímicos ou moleculares.

**Dextrocardia:** coração posicionado do lado direito do tórax.

**Displasia:** organização anormal de células em um tecido pode resultar em alteração estrutural clinicamente aparente.

**Displasia esquelética:** desordem hereditária com prejuízo do crescimento, densidade e organização de cartilagens e ossos.

**Distrofia:** distúrbio do crescimento celular ou do tecido causado por falta desnutrição.

**Encefalocele:** herniação do cérebro e/ou meninges através de defeito no crânio.

**Fissura labial com ou sem fissura palatina:** fenda parcial ou completa do lábio superior, com ou sem fenda da região alveolar ou do palato duro.

**Fissura palatina:** defeito no fechamento do palato mole e/ou duro atrás do forame incisivo.

Focomelia: ausência completa ou parcial de membros.

Gastrosquise: evisceração do intestino (outros órgãos como fígado e baço também podem eviscerar) através de um pequeno defeito na parede abdominal anterior, localizada ao lado de um cordão umbilical intacto. As vísceras não estão recobertas por saco membranoso.

Genitália ambígua: sexo indeterminado, não se permite a definição imediata do sexo fenotípico.

Hemangioma: lesões vasculares na pele e outros tecidos, compostos por espaço endotelial e estroma fibromucinoso. Cor avermelhada ou azulada.

Hénia diafragmática: herniação do tórax de conteúdo abdominal devido à defeito do diafragma, inclui ausência total do diafragma.

Higroma cístico: acúmulo de líquido anormal na região cervical.

Hipertelorismo: distância aumentada entre as duas órbitas oculares, com aumento da medida interpupilar.

Hipoplasia: proliferação celular reduzida, resultando em órgão ou característica morfológica subdesenvolvida.

Hipospádia: abertura da uretra na superfície ventral do pênis, distal ao sulco.

Hipotelorismo: distância reduzida entre as duas órbitas oculares.

Holoprosencefalia: clivagem incompleta dos hemisférios cerebrais.

Malformação: defeito morfológico de um órgão, parte de um órgão ou região maior do corpo resultante de um processo de desenvolvimento intrinsecamente anormal. Exemplos: alterações cromossômicas e gênicas como fator intrínseco.

Malformação congênita: alteração morfológica que resulta em estruturas deformadas, incompletas ou não formadas.

Microcefalia: crânio pequeno congênito, definido por um perímetro cefálico abaixo do 3º desvio-padrão das curvas apropriadas para idade e sexo.

Microlisencefalia: padrão girial simplificado, superfície cortical lisa.

Microgiria: circunvoluções do córtex cerebral anormalmente reduzidas.

Micrognatia: diminuição da mandíbula.

Microtia: ausência de partes do pavilhão (com ou sem atresia do canal auditivo).

Oligodrâmnio: redução de líquido amniótico.

Onfalocele: herniação do conteúdo abdominal através da inserção umbilical e coberta por uma membrana que pode ou não estar intacta.

Síndrome malformativa: conjunto de anormalidades congênicas que se repetem em padrão constante.

Tetralogia de Fallot: cardiopatia congênita caracterizada por defeito septal ventricular, deslocamento da aorta, estenose do infundíbulo pulmonar e, frequentemente, hipertrofia ventricular direita.