

ISABELA NELLY MACHADO

**DETECÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA POR HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA COMPARATIVA BASEADA EM MICROARRANJOS
(*array CGH*) EM FETOS DISMÓRFICOS**

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI

**Unicamp
2010**

ISABELA NELLY MACHADO

**DETECÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA POR HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA COMPARATIVA BASEADA EM MICROARRANJOS
(*array CGH*) EM FETOS DISMÓRFICOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI

**Unicamp
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M269d	Machado, Isabela Nelly Detecção de instabilidade genômica por hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (<i>array CGH</i>) em fetos dismórficos / Isabela Nelly Machado. Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Ricardo Barini Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Diagnóstico pré-natal. 2. Anomalias cromossômicas. 3. Biologia molecular. 4. Genética humana. 5. Arranjos de DNA. 6. Genômica. I. Barini, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Detection of Genomic Instability by Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (array CGH) in Dysmorphic Fetuses

Keywords:

- Prenatal diagnosis
- Chromosome aberrations
- Molecular biology
- Human genetic
- DNA array
- Genomic

Titulação: Doutor em Tocoginecologia
Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Barini
Profa. Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa Aguiar
Prof. Dr. Antônio Fernandes Moron
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Profa. Dra. Eliana Martorano Amaral

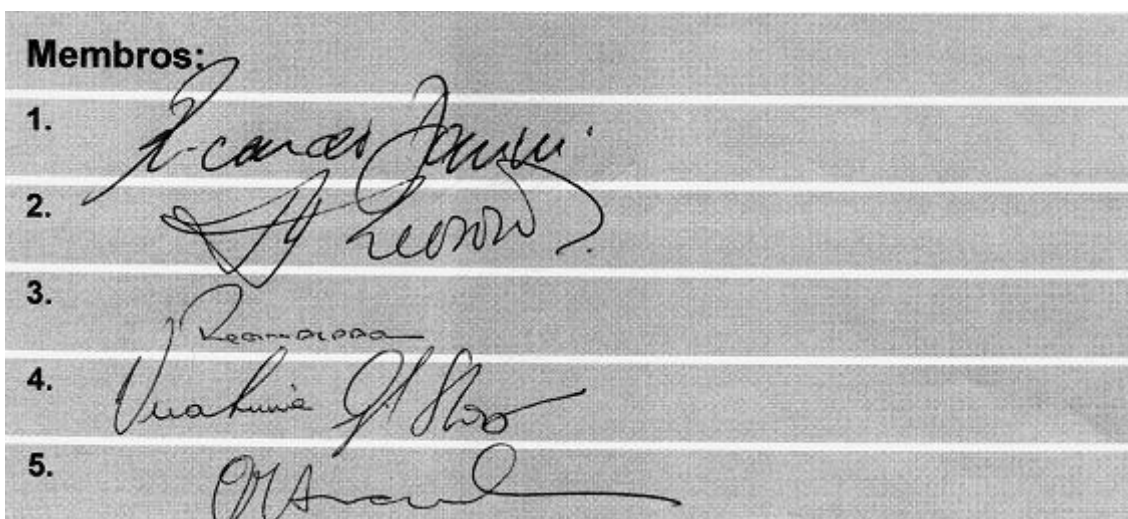
Data da defesa: 25 – 02 – 2010

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ISABELA NELLY MACHADO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI



Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 25/02/2010

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais,
Cirilo e Marcília,
pela genética e ambiente de fé transmitidos,
herança que carrego comigo na trajetória da minha vida.*

*Aos meus irmãos,
Daniela, Rafaela e Thales,
pela diversidade de genes que compartilhamos
e imensidão de sonhos que nos permitimos.*

*Aos meus sobrinhos,
Laura, Henrique, Miguel, Taciana, Tamires, Marina, Pedro, Igor e Rafael,
pela certeza da continuidade e melhoramento genético.*

*Ao meu amor **Arthur,**
pelos sentimentos que transcendem as teorias da ciência moderna,
o genoma escolhido para compartilhar comigo o processo de VIVER.*

Agradecimentos

Este trabalho é resultado do esforço de muitas pessoas e gostaria de agradecer, dentre elas, de maneira especial e sincera:

*Ao **Professor Dr. Ricardo Barini**, por me conduzir nos caminhos do mestrado e do doutorado, orientando minhas decisões profissionais, imprimindo-me a capacidade de sonhar o que parece inalcançável, acreditando em mim incondicionalmente, moldando-me como pesquisadora e presenteando-me com sua amizade.*

*À **Dra. Juliana Karina Heinrich**, pela sabedoria com que coordena a equipe dos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM, pela paciência com que me ensinou os primeiros passos da citogenética, pelo incentivo oportuno, sugestões preciosas, colaboração irrestrita, orientação competente. A verdadeira mitocôndria deste projeto, nada disso seria possível sem você!*

*À **Professora Dra. Ilza Maria Urbano Monteiro**, pelo exemplo de docência proporcionado pela rica convivência com os alunos do quarto ano médico, por aceitar participar do meu exame de qualificação mesmo estando em férias, enriquecendo este trabalho.*

*À **Professora Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**, exemplo de dedicação acadêmico-científica, pela rica discussão que contribuiu de forma carinhosa e preciosa nas fases de qualificação e defesa da tese.*

*Ao **Professor Dr. Antônio Fernandes Moron** e **Professora Eliana Martorano Amaral**, grandes nomes da Obstetrícia brasileira, que muito me honraram como criteriosos avaliadores desta tese.*

*À **Professora Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa Aguiar**, brilhante sábia da Genética Aplicada à Ginecologia e Obstetrícia, sempre ao meu lado desde o início da minha caminhada acadêmica, oferecendo-me com um amor gratuito de mãe um pouco da sua fascinante vida profissional e pessoal para perpetuar seu legado de paixão e ética, minha eterna gratidão e admiração.*

*À Comissão de Pós Graduação em Tocoginecologia do DTG/FCM/Unicamp, especialmente na pessoa de sua coordenadora a **Dra. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva**, pelo apoio oferecido em diversas fases do projeto.*

*Aos colegas do Setor de Ecografia do CAISM, especialmente ao **Dr. Kleber Cursino Andrade, Dr. Cleisson Fábio Andriolli Peralta e Dra. Cristina Faro**, pela ajuda com a coleta e envio do material para análise.*

*Aos especialistas da PerkinElmer®, **Christopher Williams, Audrey Yumi Otsuka e Loraine Veiga**, pela inesgotável assistência técnica em todas as fases do projeto e pela torcida pelo sucesso.*

*Às **famílias dos pacientes**, que generosamente concordaram em participar deste estudo durante um período de turbulência emocional em suas vidas.*

*A todos os funcionários, alunos e professores que comigo conviveram ao longo destes quatro anos nos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM, **Cássia, Mara, Lucia, Renata, Lucilene, Alex, Sr. Amilton, Alexandre, Fernanda, Dra. Tereza, Elisabete Campos, Denise Moraes, Dr. Fernando Guimarães, Raquel e Thati**. Com vocês aprendi o verdadeiro significado de “dividir a bancada”. Foi realmente maravilhoso trabalhar com pessoas tecnicamente qualificadas, profissionalmente comprometidas, e acima de tudo, afetivamente grandiosas.*

“ Toda a ciência seria inútil se,
por detrás de tudo aquilo que faz os homens conhecer,
eles não se tornassem mais sábios, mais tolerantes,
mais mansos, mais felizes, mais bonitos ”

Rubem Alves

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Summary	xix
1. Introdução	21
1.1. Malformações Congênicas	21
1.2. Anomalias Cromossômicas	25
1.3. Diagnóstico das Anomalias Cromossômicas	33
1.4. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)	39
2. Objetivos	45
2.1. Objetivo Geral	45
2.2. Objetivos Específicos	45
3. Sujeitos e Método	47
3.1. Desenho do estudo e tamanho amostral	47
3.2. Seleção de sujeitos, coleta das amostras e dos dados clínicos	47
3.3. Técnicas, exames e testes	49
3.3.1. Preparação do DNA	49
3.3.2. Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array CGH) ...	50
3.4. Análise estatística, classificação e interpretação dos resultados	53
3.5. Aspectos Éticos	56
4. Publicações	57
4.1. Artigo 1	59
4.2. Artigo 2	72
4.3. Artigo 3	90
4.4. Artigo 4	102
5. Discussão	117
6. Conclusões	133
7. Referências Bibliográficas	135
8. Anexos	149
8.1. Anexo 1 – Ficha clínica	149
8.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	150

8.3. Anexo 3 – Normas de Armazenamento de Material Biológico Humano no Âmbito de Projeto de Pesquisa	151
8.4. Anexo 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	152
8.5. Anexo 5 – Resumo das características clínicas, citogenéticas e concentração de DNA extraído dos 49 fetos incluídos no estudo	154
8.6. Anexo 6 – Resumo das características clínicas e moleculares dos 13 casos com perdas e ganhos genômicos considerados significativos dos pontos de vista citogenético e clínico	155
8.7. Anexo 7 – Classificação dos clones alterados dentro dos grupos de malformações fetais	156

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- μl** – Microlitro(s)
- BAC** – *Bacterial Artificial Chromosomes*
- CAISM** – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
- CGH** – *Comparative Genomic Hybridization*
- CNV** – *Copy Number Variation*
- Cy3** – Cianina 3
- Cy5** – Cianina 5
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- ECLAMC** – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas
- EDTA** – Solução balanceada com tripsina sem íons, cálcio e magnésio, e com um agente quelante
- FISH** – *Fluorescent in situ hybridization*
- Kb** – Quilobase(s)
- Mb** – Megabase(s)
- ml** – Mililitro(s)
- ng** – Nanograma(s)

- nm** – Nanômetro(s)
- PAC** – *P1 Artificial Chromosomes*
- pb** – Pares de bases
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- SKY** – *Spectral Karyotyping*
- UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Introdução: Para uma parcela significativa de fetos com defeitos congênitos o diagnóstico síndrome permanece indefinido, dificultando a abordagem perinatal, o estabelecimento de prognóstico e o aconselhamento genético. A incapacidade de detecção de pequenas instabilidades genômicas, atualmente apontadas como provável fator causal nestas condições dismórficas, é a principal limitação do estudo cromossômico microscópico pelo bandamento G (cariótipo convencional). A hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization*–CGH) é capaz de identificar perdas e ganhos de material genômico com alta resolução, sem envolver o cultivo celular e o conhecimento prévio da região genômica envolvida.

Objetivo: Avaliar a aplicabilidade da técnica de *array* CGH em sangue fetal para o diagnóstico de perdas e ganhos genômicos em um grupo de fetos dismórficos.

Sujeitos/Método: Foi realizado um estudo prospectivo descritivo a partir de amostras sanguíneas de fetos dismórficos e com cromossomos numericamente normais ao bandamento G, admitidos no Setor de Medicina Fetal do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foi realizada a caracterização da amostra estudada e uma análise descritiva dos achados moleculares através da técnica de *array* CGH.

Resultados: Foram incluídos no estudo 50 fetos, dos quais 49 preencheram os critérios de qualidade da técnica. A taxa de detecção de alterações cromossômicas pela técnica de *array* CGH não detectadas pelo cariótipo convencional foi de 93,7% (45 fetos), e 27% foram consideradas significativas dos pontos de vista citogenético e clínico. Entre os fetos com alterações do número de cópias, 87% apresentaram pelo menos um clone para o qual já estão descritas variações do número de cópias (CNV) em indivíduos fenotipicamente normais. Adicionalmente, a técnica mostrou-se eficaz para o esclarecimento diagnóstico da origem, exata localização e dimensionamento do material adicional encontrado em um feto com anomalia cromossômica estrutural. **Conclusões:** A caracterização do perfil genômico por *array* CGH de fetos com defeitos congênitos permitiu complementar o diagnóstico citogenético convencional, aumentando a definição diagnóstica e a identificação de regiões cromossômicas associadas a algumas anomalias congênitas.

Summary

Introduction: A great number of fetuses with congenital defects remain without definitive diagnosis, making difficult the perinatal management, the prognosis establishment and the genetic counseling. The incapacity of detection of short sequence copy number changes, pointed as a probable etiology factor for some congenital defects, is the main limitation of routine G-banding. The Comparative Genomic Hybridization (CGH) overcome this limitation, and also does not require cellular culture or prior knowledge of the involved genomic region. **Objective:** To evaluate the applicability of the CGH method on fetal material for genomic gains and losses in a group of malformed fetuses. **Methods:** On a prospective descriptive study, fetal blood samples were collected from malformed fetuses with numerically normal chromosomes at G-banded karyotype, at the Fetal Medicine Unit of the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Sample characterization and a descriptive analysis of the CGH-based technique results were accomplished. **Results:** Fifty fetuses were included in this study and 49 were considered optimal according to adopted quality control criteria. The detection rate of fetuses with copy number imbalances not detected by the G-banded karyotype was 93.7% (45 fetuses),

with 27% of cytogenetic and clinical significance. Among fetuses with copy number imbalances, 87% presented at least one abnormal clone encompassing CNVs described for phenotypically normal individuals. Additionally, the array CGH showed to be effective for the identification of the additional genetic material origin, with its precise location and size, presented in one fetus with structural chromosomal anomaly. **Conclusions:** The genomic profile characterization of malformed fetuses through array CGH allowed complementing the conventional cytogenetic diagnosis, obtaining a higher precise diagnosis and the identification of chromosomal regions associated with some congenital anomalies.

1. Introdução

1.1. Malformações Congênitas

Define-se como malformação congênita a variante anatômica e funcional do padrão normal do indivíduo presente ao nascimento (1). Uma definição mais ampla inclui toda anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento do feto decorrente de fator originado antes do nascimento, seja genético, ambiental ou desconhecido, mesmo quando sua manifestação for tardia e não for aparente no recém-nascido (2). As malformações congênitas, portanto, englobam uma grande variedade de alterações, podendo ser únicas ou múltiplas em um mesmo indivíduo.

Cerca de 2% a 5% dos recém-nascidos vivos apresentam pelo menos uma anomalia congênita identificável ao nascimento (2), variando desde anomalias discretas até graves defeitos que comprometem a sobrevivência. Dados oriundos de estudos internacionais e do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC) confirmam que a incidência na América Latina não difere, significativamente, daquela encontrada em outras regiões do mundo, apesar de ainda existirem sub-registros (3). A inclusão de um campo de notificação sobre

defeitos congênitos em um documento oficial e de preenchimento obrigatório no Brasil a partir de 1999, o campo 34 da Declaração de Nascido Vivo, vem se tornando fundamental para a obtenção de informações sobre a frequência dos defeitos congênitos, bem como de características epidemiológicas destes recém-nascidos e suas famílias (4, 5).

As malformações congênitas vêm apresentando relevância crescente como causa de sofrimento e prejuízos à saúde da população, sendo responsáveis por uma grande porcentagem da morbi-mortalidade perinatal (6-8). 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 (9) e são responsáveis por altas taxas de cesarianas e prematuridade (5). Como a taxa de mortalidade infantil por malformações congênitas tem se mantido constante nas últimas décadas e as demais causas de óbitos em menores de um ano de idade sofreram um decréscimo significativo com a melhoria das condições de vida da população brasileira, 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 (10).

Além da morbimortalidade, outra questão envolvida nas malformações congênitas é a cronicidade. Muitas malformações levam a problemas crônicos de saúde, necessitando de tratamentos contínuos e, não raramente, com altos custos. A abordagem destes pacientes envolve, além do tratamento médico, serviços complementares como fisioterapia, fonoaudiologia, terapia ocupacional, educação

especial ou inclusiva. Outras consequências sociais incluem a perda da produtividade por incapacidade ou morte e a perda na arrecadação salarial familiar do responsável pelos cuidados da criança (9). Sobrepoem-se ao quadro social as consequências psicológicas da constatação da situação de “anormalidade” do feto, que pode representar uma ferida narcísica ou uma quebra da integridade psíquica do casal e provocar sentimentos de perda e inadequação (11).

A introdução do exame ultrassonográfico na assistência pré-natal permitiu identificar, ainda no ambiente intrauterino, as malformações congênitas. A identificação das malformações ocorre diretamente pela detecção das alterações morfológicas ou indiretamente, através de sinais como retardo de crescimento fetal e alterações do volume de líquido amniótico. Os progressos tecnológicos da ultrassonografia, a maior experiência acumulada pelos serviços especializados e o maior acesso da população aos serviços de ultrassonografia, têm contribuído para um aumento significativo da detecção de fetos com malformações congênitas em populações de baixo risco, tornando-se parte da rotina dos cuidados pré-natais.

Concomitantemente, o aumento do acesso a estudos citogenéticos levou à procura do conhecimento sobre a correlação entre achados morfológicos ultrasonográficos e alterações do cariótipo (12, 13). Neste sentido, os estudos revelaram que, apesar de existir um risco inerente de o feto se apresentar cromossomicamente anormal para todas as gestantes, este risco aumenta com o avançar da idade materna e diminui com o avançar da idade gestacional (14, 15). Outro achado evidenciado é que a frequência de anomalia cromossômica é proporcionalmente maior, quanto maior for o número de malformações detectadas

à ultrassonografia (16, 17), porém, as anomalias cromossômicas estruturais são mais frequentes no grupo de fetos com malformações isoladas, quando comparado com fetos que apresentam múltiplas malformações (18).

A ultrassonografia na identificação de fetos portadores de cromossomopatias mostrou-se um método com alto valor preditivo negativo, o que corresponde dizer que na ausência de malformações detectadas, a possibilidade de o feto ter uma anomalia cromossômica é baixa (16, 18-20). Juntando-se estas evidências ao fato de que a maioria dos fetos afetados é gerada por mulheres jovens e sem fator de risco identificado (16, 21), a ultrassonografia com ênfase na busca de malformações fetais que se relacionam com anomalias cromossômicas é recomendada em todas as gestantes, em mais de uma ocasião durante a gestação.

As causas genéticas, isoladamente ou em conjunto com causas ambientais, estão envolvidas em pelo menos um terço das malformações congênitas. Dentre as causas genéticas, as anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais estão presentes em cerca de 0,9% de uma amostra não selecionada de recém-nascidos (22) e em mais de 10% dos natimortos (23). A frequência geral de anomalias citogenéticas em fetos malformados é de aproximadamente 10% a 15% (24). Destes, cerca de 80% são trissomias dos cromossomos 13, 18 ou 21. O restante, envolve alterações numéricas nos cromossomos sexuais e rearranjos cromossômicos estruturais (25). Torna-se justificável, portanto, a conduta de se indicar a análise cromossômica de todos os natimortos e neomortos, com ou sem fenótipos dismórficos, e de todos os fetos com malformações, principalmente quando estão presentes mais de uma anomalia ou quando há história familiar de malformações congênitas.

O diagnóstico pré-natal dos fetos portadores de malformações congênitas e cromossômicas justifica-se pela possibilidade de interrupção da gestação, em alguns casos, e pela programação da assistência perinatal. Além disso, a alta incidência de óbito fetal com subsequente maceração fetal pode dificultar a análise citogenética pós-natal, inviabilizando muitas vezes o diagnóstico definitivo e o aconselhamento do casal para futuras gestações. Entretanto, mesmo adotando esta abordagem, uma significativa parcela das anomalias congênitas permanece com etiologia desconhecida.

1.2. Anomalias Cromossômicas

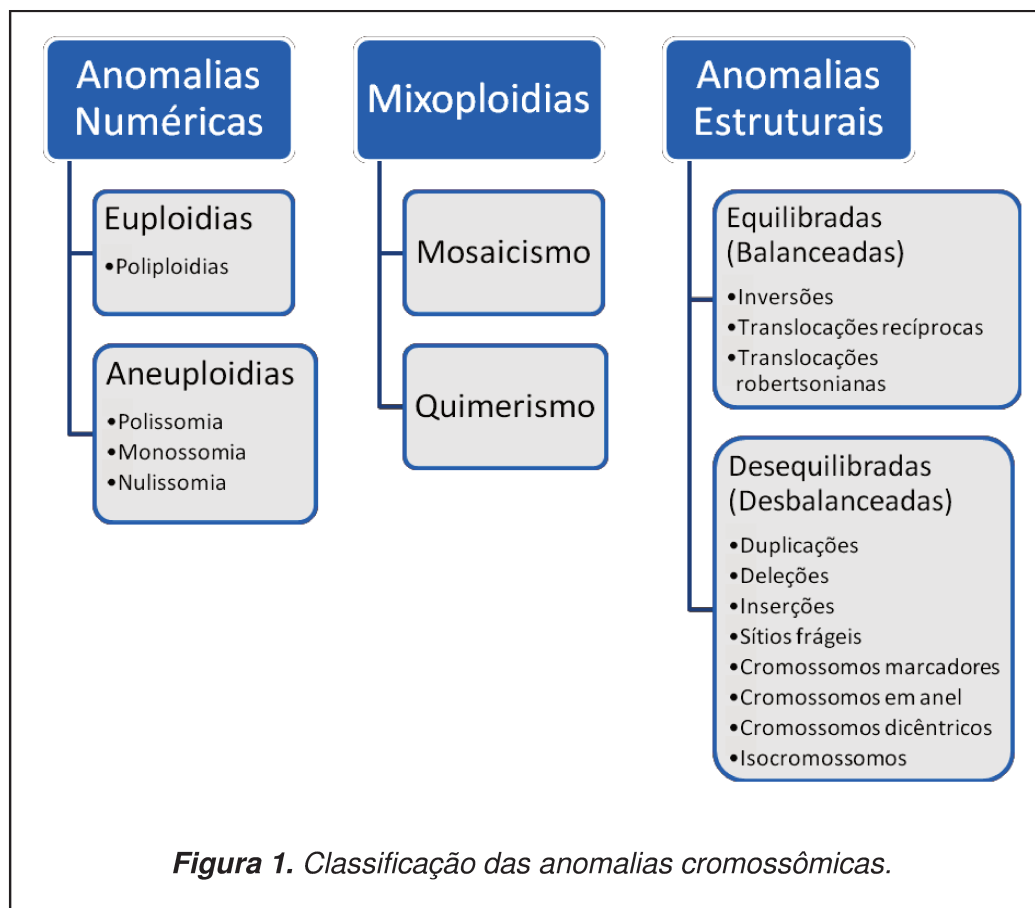
Genoma é o termo usado para designar um complemento total de genes em uma célula, um indivíduo ou uma espécie (26). Os gametas possuem uma cópia do genoma e são chamados haplóides, enquanto as células somáticas apresentam duas cópias e são chamadas diplóides. A informação genética nas células humanas está organizada em dois tipos de genoma: o nuclear e o mitocondrial. A grande maioria dos genes localiza-se no núcleo (genoma nuclear) e alguns poucos são extranucleares (genoma mitocondrial). Trataremos nesta abordagem somente do genoma nuclear.

Ao conjunto de cromossomos de um indivíduo, tecido ou linhagem celular, chama-se cariótipo (26). Nas células humanas normais existem 46 cromossomos, dos quais 44 formam 22 pares chamados autossomos e numerados de 1 a 22. Os outros 2 cromossomos formam o par de cromossomos sexuais, designados X e Y. O sexo feminino é determinado pela presença de dois cromossomos X (46,XX)

enquanto o sexo masculino pela presença de um X e um Y (46,XY). A representação sistemática por fotografia ou imagem digitalizada dos cromossomos de uma célula é chamada cariograma, enquanto que sua representação gráfica é chamada idiograma.

Anomalias cromossômicas são definidas como quaisquer alterações nos cromossomos, podendo ser numéricas ou estruturais (27). As anomalias numéricas envolvem o ganho ou perda de um ou mais cromossomos completos e as anomalias estruturais envolvem alterações na estrutura de parte de um ou mais cromossomos. As anomalias numéricas e estruturais podem existir na forma de mixoploidia. Nesta situação, existem duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um mesmo indivíduo, e inclui o mosaicismo e o quimerismo. No mosaicismo, as linhagens celulares são derivadas de um mesmo zigoto e, na grande maioria dos casos, a linhagem celular anormal apresenta uma aberração cromossômica numérica. No quimerismo, as linhagens celulares são provenientes de zigotos diferentes. O grau com que um indivíduo é clinicamente afetado geralmente depende da porcentagem de células anormais. A Figura 1 apresenta de forma esquemática a classificação dos tipos mais comuns de anomalias cromossômicas.

As **anomalias numéricas** são subdivididas em euploidias quando há aumento ou diminuição de pelo menos um conjunto haplóide completo, e aneuploidias, quando há ganho ou perda de um ou mais cromossomos, mas não de todos eles (28). As aneuploidias podem ser formadas pelo aumento do número de cromossomos homólogos, as polissomias (trissomias, tetrassomias, etc), pela ausência de um homólogo, a monossomia, e pela ausência dos dois cromossomos homólogos, a nulissomia.



As **anomalias estruturais** são também conhecidas como rearranjos cromossômicos e surgem a partir de quebras cromossômicas reparadas incorretamente, e apresentam uma frequência de aproximadamente 16% de todas as aberrações cromossômicas (28). Os pontos de quebra que levam a rearranjos cromossômicos podem ocorrer em todo o genoma, porém são mais frequentes nas regiões pericentroméricas e subteloméricas, ricas em pequeno número de cópias repetidas (*low-copy repeats* – LCR), sugerindo que os rearranjos não acontecem de forma totalmente aleatória (29). Os rearranjos podem ser intercromossômicos quando envolvem cromossomos diferentes, intracromossômico entre cromátides irmãs ou intracromátides, entre regiões na mesma cromátide (30).

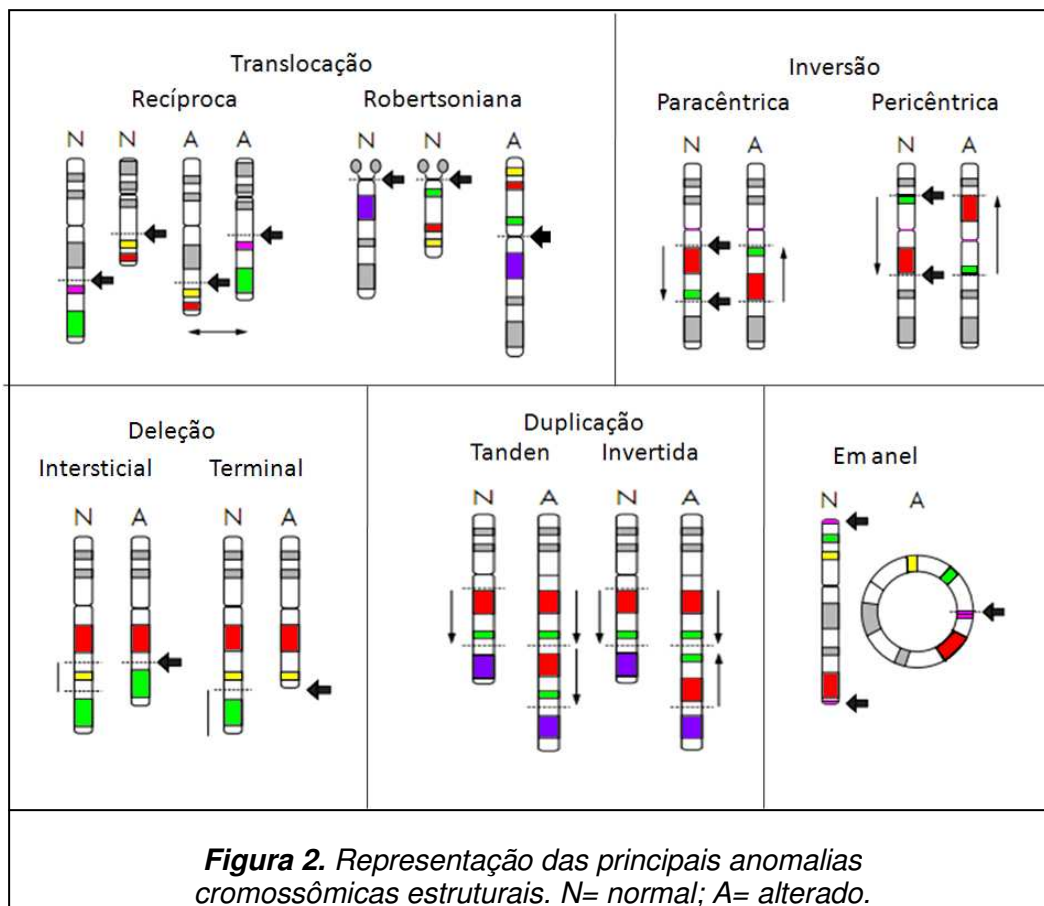
De acordo com o modo de transmissão, as anomalias estruturais podem ser classificadas como familiar, quando são herdadas dos progenitores (materna ou paterna), ou *de novo*, quando não herdadas dos progenitores. Os rearranjos cromossômicos estruturais podem ainda ser classificados como complexos quando envolvem pelo menos três pontos de quebra e a troca de material genético entre pelo menos três cromossomos (31). As anomalias cromossômicas estruturais são mais frequentes no grupo de fetos com malformações isoladas, quando comparados com fetos que apresentam múltiplas malformações (18).

As anomalias estruturais que não envolvem ganho ou perda de material genômico são ditas balanceadas e geralmente não acarretam efeito fenotípico, embora possam estar associadas a retardo mental, esterilidade, quadros síndrômicos ou anomalias congênitas isoladas em cerca de 0,3% dos casos (32). Sua frequência é estimada em 3/1.000 adultos (23). A Figura 2 apresenta a representação gráfica dos tipos mais comuns de anomalias estruturais.

As **deleções** envolvem a perda de regiões específicas de um cromossomo, com efeitos fenotípicos que dependem da dimensão e dos genes presentes no material genético perdido. A incidência de deleções citogeneticamente visíveis é de aproximadamente 1/7.000 nascidos vivos (23).

Inversamente, quando há a inserção de um segmento cromossômico em outro cromossomo, com ganho de um material genético adicional, surgem as **inserções ou duplicações**, e parecem ter consequências fenotípicas menos graves que as deleções (23). As inserções que produzem uma segunda cópia da

região cromossômica na mesma direção (3' ou 5') da cópia original são chamadas inserções em *tandem* ou diretas. Aquelas em que a direção da cópia extra é oposta à direção da original são chamadas inserções em espelho ou invertidas.



As deleções e inserções, dependendo de sua localização no cromossomo, podem ser ainda classificadas em terminais, quando envolvem as extremidades cromossômicas, ou intersticiais, quando a alteração ocorre na porção média do cromossomo. As deleções e inserções criam as nulissomias parciais e trissomias parciais, respectivamente.

Por sua vez, as **inversões** surgem na presença de duas quebras em um único cromossomo, cujo segmento contido entre as quebras gira 180° e religa-se para formar um cromossomo que, estruturalmente, apresenta um erro de interrupção da sequência gênica (28). Se o segmento invertido envolver o centrômero, a inversão é chamada pericêntrica, e quando não envolve o centrômero, paracêntrica. Embora o portador de uma inversão possa ser completamente normal, pois não há perda ou ganho de material genético, existe um risco aumentado para a produção de embriões cromossomicamente desbalanceados, uma vez que cromossomos invertidos apresentam dificuldade de pareamento com seu homólogo na meiose, resultando em gametas que contêm cromossomos derivados desbalanceados, se um *crossing-over* desigual ocorrer.

As **translocações** envolvem troca de material entre dois ou mais cromossomos, geralmente não homólogos, a partir de pelo menos uma quebra em cada cromossomo envolvido. Existem dois tipos de translocações, as balanceadas e as robertsonianas.

Nas translocações balanceadas ou recíprocas, a troca de material genético acontece sem que o número total de material genético se altere. Os portadores dessa translocação são fenotipicamente normais, mas há um maior risco de a prole apresentar alterações fenotípicas, devido à produção de gametas anormais. Sua frequência é estimada em 1/600 nascidos vivos (23). A exemplo das inversões, quando este gameta combina-se com um gameta normal, do outro progenitor, o resultado é um embrião desbalanceado, parcialmente monossômico para uma região cromossômica e parcialmente trissômico para outra região.

As translocações robertsonianas ocorrem quando dois cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22) perdem seus braços curtos e se unem próximo à região centromérica, formando um único cromossomo derivado. Apesar de resultar em um indivíduo com 45 cromossomos, não há alterações fenotípicas, pois os braços curtos em geral são genes de RNA ribossomal em múltiplas cópias.

Outros tipos de anomalias cromossômicas incluem os cromossomos em anel e os isocromossomos (28). Os **cromossomos em anel** formam-se quando um cromossomo sofre duas quebras e as extremidades fraturadas se unem, formando uma estrutura cromossômica em anel. O **isocromossomo** é um cromossomo no qual há uma perda de um dos braços que é “substituído” por outro braço pertencente a outro cromossomo, em uma imagem em espelho. A consequência é um conjunto de 46 cromossomos que carregam uma cópia de um braço de um cromossomo específico (monossomia parcial) e três cópias do braço do outro cromossomo envolvido (trissomia parcial).

Em algumas situações, os mecanismos moleculares envolvidos nas anomalias estruturais podem gerar cromossomos muito pequenos, não identificáveis mesmo com o bandamento de alta resolução, os **cromossomos marcadores**. A maioria deles é derivada dos cromossomos acrocêntricos e, frequentemente, aparecem na forma de mosaicos (33). Sua prevalência é estimada em 0,14 a 0,72/1.000 nascidos vivos (34).

Existem algumas regiões cromossômicas que apresentam um alto grau de variabilidade em dimensão, morfologia e padrão de coloração e que ocorrem

com certa frequência em indivíduos considerados normais (35-37). São, portanto, variantes estruturais da normalidade. As teorias que tentam explicar a falta de consequências fenotípicas sugerem o envolvimento de baixa densidade gênica, genes inativos ou haplosuficiência (a célula funciona normalmente com apenas uma cópia gênica) das regiões acometidas (38). De maneira ampla, estas alterações “inofensivas” ou “silenciosas” são chamadas de polimorfismos. Existe um ponto de corte arbitrário para a frequência do alelo alterado na população geral de 1%, a partir do qual uma condição pode ser classificada como polimórfica, diferenciando-a de uma mutação (39). Alguns autores sugerem que o termo polimorfismo deve ser empregado em um contexto molecular ou gênico, e os termos heteromorfismo e variante em um contexto cromossômico (38).

Os polimorfismos gênicos podem ser compreendidos com base na constatação de que, para cada gene no genoma humano normal, existem quase sempre duas cópias, mas que fragmentos de DNA de dimensões variadas podem apresentar-se em diferentes números de cópias em situações clínicas de normalidade. Estas variações podem ser tanto deleções quanto duplicações do número de cópias, gerando um desequilíbrio genômico quando comparadas com um genoma “normal”, contribuem de forma significativa para a variação genética e são conhecidas como **variações do número de cópias - CNV** (*copy number variations*) (40). Estas variantes genômicas são geralmente herdadas e podem compreender até 12% do genoma (41).

Com os recentes avanços nas técnicas de biologia molecular empregadas na citogenética, assiste-se a um aumento significativo no número de

CNVs descritos. Bancos de dados digitais e de acesso público são atualizados e disponibilizados para consulta, a fim de auxiliar na interpretação dos resultados obtidos principalmente pela citogenética molecular (42, 43).

1.3. Diagnóstico das Anomalias Cromossômicas

A análise microscópica dos cromossomos tem sido o padrão-ouro para o diagnóstico das anomalias cromossômicas desde o desenvolvimento da técnica do bandamento G, no final da década de 60 (44). Resumidamente, após o período de crescimento celular, é realizado o bloqueio das células em metáfase. Nesta fase, como a duplicação da molécula de DNA já aconteceu, os cromossomos exibem duas cromátides e o centrômero. A técnica inclui o rompimento da membrana celular com uma solução salina hipotônica, fixação e coloração. A análise é realizada em, pelo menos, 15 a 20 células, havendo a indicação de um maior número de células para os casos suspeitos de mosaicismo. As metáfases são documentadas e analisadas manualmente ou com o auxílio de *softwares* de captura e análise de imagens.

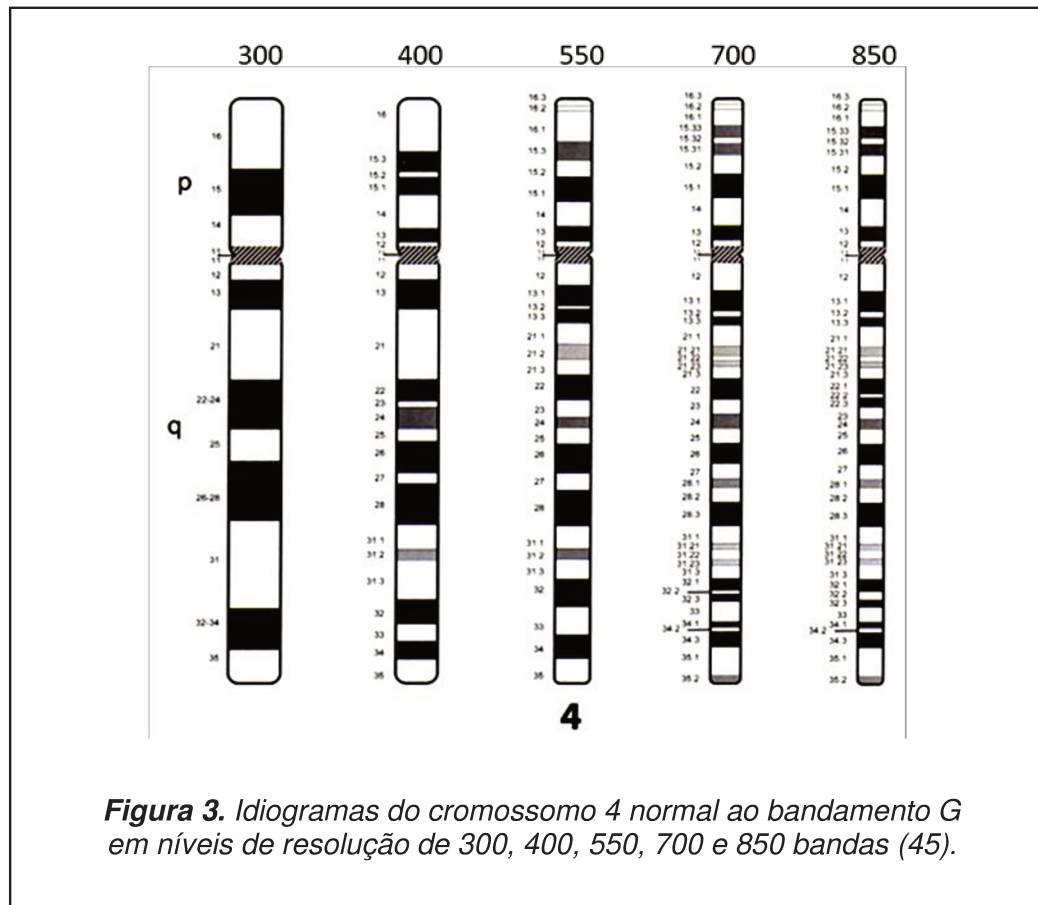
As técnicas convencionais atuais de cariotipagem por coloração e bandagem de células em divisão e sob uma microscopia com 10.000x de aumento são capazes de detectar anomalias cromossômicas numéricas e estruturais que tenham pelo menos de 5 a 10 milhões de pares de base de DNA (5Mb a 10Mb), que corresponde ao poder de resolução do método e contém uma “banda” cromossômica.

Uma banda cromossômica é definida como o segmento do cromossomo que pode ser distinguível do segmento adjacente pela diferença na aparência clara ou escura nas diferentes técnicas de bandamento. Os cromossomos aparecem como sequências contínuas de faixas claras e escuras (bandas), onde, por definição, não existem regiões “interbandas”. As bases moleculares do bandamento envolvem a composição de bases (nucleotídeos), proteínas e a organização funcional do genoma.

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. Uma região cromossômica é definida como a área compreendida entre dois pontos de referência adjacentes. As bandas e as regiões cromossômicas são numeradas consecutivamente a partir do centrômero em direção às extremidades de cada braço (p= braço pequeno, q= braço longo).

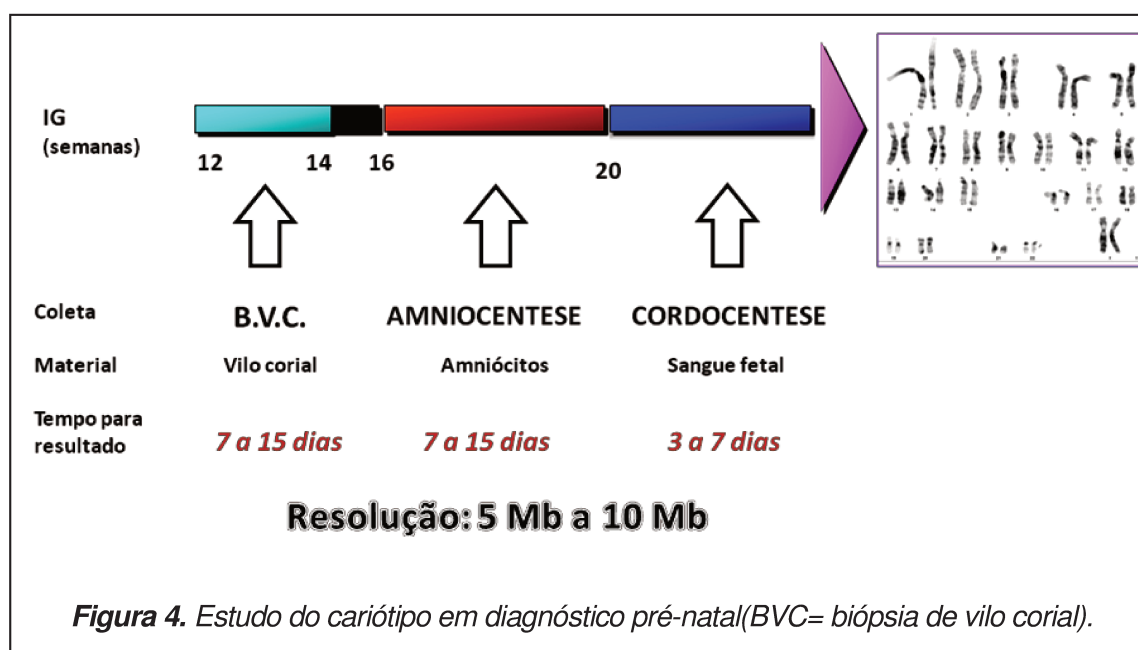
O nível de resolução de uma técnica citogenética é determinado pelo número de bandas visíveis. Existem padrões de idiogramas para 300, 400, 550, 700 e 850 bandas para todos os cromossomos (Figura 3) (45). Quanto maior o número de bandas, maior a resolução do exame e maior o poder de exclusão de pequenas deleções e anomalias estruturais. Em geral, uma resolução de 450 a 550 bandas é suficiente para a maioria das análises clínicas, incluindo o diagnóstico pré-natal (46). Em situações especiais pode-se indicar o bandamento de alta resolução, em que são analisados os cromossomos durante a prófase ou prometáfase. Esta técnica analisa os cromossomos mais estendidos que os cromossomos metafásicos, permitindo a

observação de um número maior de bandas e a detecção de anomalias menores. Classicamente, os laudos de cariótipo devem incluir o padrão de bandas verificado naquela amostra para que seu resultado seja corretamente interpretado (46).



Em Medicina Fetal, é comum a obtenção do cariótipo a partir de sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e vilosidades coriônicas, dependendo da idade gestacional. No entanto, teoricamente, é possível obter o cariótipo a partir de qualquer tecido que tenha sua viabilidade preservada e possa ser submetido ao cultivo celular para obtenção de metáfases (47). O tempo para a obtenção dos resultados varia de acordo com o material estudado, a viabilidade das células

cultivadas, as condições técnicas laboratoriais, os reagentes utilizados e o preparo da amostra, dentre outros fatores. Em média, este período é de 7 a 15 dias para cultura de vilo corial ou de líquido amniótico e de 3 a 7 dias para sangue fetal (27) (Figura 4). A preparação direta do vilo corial, sem a cultura das células, permite a obtenção de resultados em até 24 horas, mas a baixa resolução dos cromossomos limita a sua aplicação, impossibilitando, por vezes, a exclusão de anomalias estruturais.



Embora muito confiável e ainda considerada o padrão-ouro para a investigação de anomalias relacionadas aos cromossomos, a análise citogenética convencional apresenta algumas limitações, como falhas de cultivo celular e a necessidade de profissional experiente para a leitura e interpretação dos resultados de forma confiável (46). No diagnóstico pré-natal, outras limitações importantes estão relacionadas à baixa qualidade das preparações cromossômicas, obtidas em

uma parcela significativa das vezes, e que impossibilita a detecção de anomalias estruturais e microarranjos cromossômicos menores que 5Mb a 10Mb. Além disso, a necessidade de cultivo celular de longa duração acaba por impactar significativamente no tempo relativamente longo para a liberação de resultados.

Nas últimas décadas, a citogenética clínica assistiu a um extraordinário avanço das técnicas de biologia molecular. A confluência dos enfoques molecular e citogenético – a citogenética molecular – revolucionou as possibilidades e a precisão diagnóstica. O sequenciamento do genoma humano tem contribuído neste sentido, permitindo um rastreamento de maior resolução para anomalias cromossômicas. Estas alterações genômicas constituem cerca de 15% de todas as mutações que envolvem as doenças monogênicas em humanos (48). As limitações de resolução do bandamento convencional podem ser, em grande parte, superadas pelas novas técnicas moleculares, com aplicações clínicas evidentes no diagnóstico de microdeleção, rearranjos subteloméricos, cromossomos marcadores e derivados, e rearranjos gênicos (49).

A técnica molecular mais difundida é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Consiste na hibridização (ligação específica) de um DNA-molde (sonda) a seu alvo complementar em um cromossomo ou núcleo interfásico, avaliando-se a presença ou ausência de uma sequência específica de DNA ou região cromossômica. Portanto, a técnica de FISH é *locus*-específica e exige que se conheça a sequência de DNA de interesse para a escolha adequada da sonda a ser utilizada. Em Medicina Fetal, é empregada para a detecção precoce de trissomias em células não cultivadas, analisando simultaneamente cinco sondas

para os cromossomos envolvidos nas aneuploidias mais frequentes (13, 18, 21, X e Y) e para confirmação de síndromes de microdeleções ou microduplicações. A grande vantagem em relação às técnicas convencionais é o curto tempo para obtenção do resultado, sendo possível em apenas 2 horas.

Várias outras técnicas surgiram baseadas no método de FISH original. Usando sondas fluorescentes cromossomo-específicas e hibridização de um “coquetel” de 24 sondas gerado a partir da combinação de cinco fluorocromos, as técnicas de FISH multicolor (M-FISH) e cariótipo espectral (*Spectral Karyotyping* – SKY) identificam cada cromossomo pela emissão específica de pixels através de um programa de computador, com a visualização de todos os cromossomos em um único experimento. Cada cromossomo assume uma “assinatura” espectral, possibilitando a identificação de rearranjos complexos que envolvem mais de dois cromossomos, bem como a origem e o conteúdo de cromossomos marcadores (50, 51), com uma resolução de 1Mb a 5Mb para o M-FISH (52) e 1Mb a 2 Mb para o SKY (53).

A abordagem da citogenética convencional associada às técnicas moleculares no estudo das dismorfologias tem permitido uma maior correlação entre genótipo e fenótipo, com o diagnóstico de um número crescente de “síndromes de microarranjos” ou “instabilidade genômica”. Este termo “instabilidade genômica” tem sido amplamente utilizado para descrever um fenômeno que resulta no acúmulo de múltiplas modificações que levam a conversão de um genoma de uma célula normal a um genoma instável (54). Estes rearranjos cromossômicos não balanceados respondem por 1% a 2% das anormalidades em amostras

pré-natais, e podem levar a sérias consequências fenotípicas (55). A maior limitação das técnicas moleculares descritas até aqui é que estas técnicas não detectam estas “instabilidades genômicas”.

1.4. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A hibridização genômica comparativa (comparative genomic hybridization – CGH) foi desenvolvida como método de rastreamento genômico amplo, na tentativa de se identificar desequilíbrios no número de cópias do DNA, ou seja, as instabilidades genômicas. Desenvolvida em 1992, a técnica de CGH consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes (56). A técnica original utilizava metáfases normais fixadas em lâmina e é conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional.

A técnica de CGH metafásico teve sua principal aplicabilidade na área de genética do câncer (57-59). Outras aplicações clínicas como em dismorfologias, distúrbios mentais e de aprendizagem também foram testadas, evidenciando um aumento no diagnóstico de deleções ou duplicações não identificadas pelo bandamento G (60, 61). Para o diagnóstico pré-natal, a técnica foi validada estudando-se retrospectivamente fetos sabidamente portadores de aneuploidias totais ou parciais (62-65), mostrando-se equivalente às técnicas citogenéticas de alta resolução, porém com a vantagem de não necessitar de cultivo celular. Um estudo nacional demonstrou sua utilidade como ferramenta complementar ao cariótipo convencional em um grupo de fetos com defeitos de fechamento da parede

abdominal (66). Entretanto, o delineamento de bandas e regiões específicas na técnica de CGH convencional é limitado pela resolução dos cromossomos metafásicos e estima-se que seja de 3Mb a 10Mb, e nela encontra-se sua maior limitação (56, 62, 67).

Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e acoplando-se à tecnologia de microarranjos (*microarrays* ou *arrays*) (68, 69), desenvolveu-se uma nova técnica de análise genômica comparativa, agora baseada em microarranjos, conhecida como *array* CGH. Basicamente, a técnica utiliza vários fragmentos pré-selecionados de DNA anexados, de forma *locus*-específica em uma superfície de vidro (lâmina de microscopia). O DNA anexado pode ser fragmentos de DNA clonados a partir de bactérias (BAC – Bacterial Artificial Chromosomes) ou de P1 (PAC - P1 Artificial Chromosomes) (70), cDNA (71), oligonucleotídeos sintéticos (72) ou fragmentos de PCR (73).

O tipo de DNA utilizado e a quantidade de regiões pesquisadas variam entre protocolos distintos ou plataformas disponíveis. A escolha das regiões incluídas na pesquisa define sua classificação em dois tipos: o *array* CGH representativo do genoma inteiro e o direcionado para regiões específicas, geralmente envolvidas em arranjos cromossômicos já descritos. A resolução obtida pelos diferentes tipos de *array* CGH depende do número e da dimensão de clones pesquisados e da distância entre clones consecutivos. Os *arrays* construídos a partir de BAC clones têm a resolução de 50kb a 150kb (74, 75) e os *arrays* de oligonucleotídeos podem chegar de 25pb a 85pb de resolução (76).

Tecnicamente, quantidades idênticas de DNA teste e DNA de referência são marcadas com fluorocromos (cianinas), e após serem co-hibridizadas, a diferença das intensidades emitidas pelas cianinas para cada região pesquisada é aferida. Quando a intensidade de fluorescência é menor na amostra testada em relação à amostra de referência, infere-se que há perda genômica na respectiva região (“deleção” ou “perda”) e, na situação contrária, infere-se ganho genômico (“duplicação” ou “ganho”).

A técnica de *array* CGH oferece importantes vantagens sobre os demais métodos de diagnóstico citogenético. Primeiramente, por não ser necessária a obtenção de metáfases e por permitir a análise do DNA extraído de diferentes tipos de tecidos, até mesmo de tecidos incluídos em parafina. Outras vantagens incluem a capacidade de investigar milhares de regiões cromossômicas em uma única análise, em um curto período de tempo e com alta resolução, superando as limitações do cariótipo convencional e do CGH metafásico.

Sua limitação inerente aos princípios da técnica encontra-se no fato de não ser capaz de identificar anomalias cromossômicas que não levam à alteração do número total de cópias de um segmento de DNA dentro do genoma, como as translocações balanceadas e inversões. Também, a normalização da intensidade de fluorescência duplicada gerada nas euploidias dificulta sua identificação. A técnica também encontra emprego limitado em casos de mosaicismos. Esta última limitação vem sendo superada com o aumento na experiência da interpretação dos resultados, e acredita-se ser possível a detecção de rearranjos cromossômicos presentes em pelo menos 20% (77) ou 50% das células (29). Há evidências

recentes de que a técnica de *array* CGH seja capaz de diagnosticar casos de mosaicismo que não haviam sido detectados pelo cariótipo convencional (78-80). Uma tentativa de se estimar o grau de mosaicismo através da comparação da média logarítmica da razão de intensidade de fluorescência entre o DNA teste e o DNA de referência e a média teórica esperada foi estudada e revelou resultados satisfatórios (81).

A aplicação clínica do *array* CGH como ferramenta diagnóstica em pacientes com distúrbios mentais e de aprendizagem, associados a características dismórficas, vem sendo exaustivamente pesquisada (82-86), mostrando-se útil e reprodutível para diagnóstico e caracterização molecular deste grupo (87-95). Estes estudos têm mostrado que a técnica de *array* CGH pode aumentar a taxa de diagnóstico em relação ao estudo citogenético convencional em 20% a 30%, culminando com sua inclusão nos fluxogramas de investigação genética deste grupo de pacientes (96).

O uso da técnica de *array* CGH na Medicina Materno-Fetal tem sido recentemente testada. Em 2004, Schaeffer et al. (97) observaram um aumento na taxa de detecção de alterações cromossômicas não identificadas pela técnica convencional em 9,8% de 41 casos de abortamentos espontâneos. Em tecido pulmonar congelado de 49 fetos com múltiplas malformações e com cariótipo normal que evoluíram para abortamento espontâneo ou interrupção eletiva da gestação, Le Caignec et al. (98), em 2005, identificaram aumento na taxa de detecção de 16,3%, usando a técnica de *array* CGH. Em um outro trabalho retrospectivo, Rickman et al. (25) validaram duas plataformas de *array* CGH em 30 amostras de líquido amniótico e vilo corial.

Após os estudos iniciais retrospectivos que introduziram a validação da técnica de *array* CGH para diagnóstico pré-natal, começaram a surgir os primeiros estudos prospectivos. Em recentes publicações, Van den Veyver et al. (99) encontraram achados anormais em 4,8% de 84 fetos com malformações à ultrassonografia, e Kleeman et al. (100) encontraram a porcentagem de 8% avaliando somente os fetos com cariótipo convencional normal, mostrando que a técnica de *array* CGH é uma ferramenta promissora no diagnóstico pré-natal.

Concluindo, a caracterização do perfil genômico de fetos com defeitos congênitos permite complementar o diagnóstico citogenético, mostrando alterações que não poderiam ser detectadas devido ao nível de resolução obtido com o bandamento G convencional. Mesmo as técnicas diagnósticas moleculares atuais são incapazes de detectar pequenas instabilidades genômicas, provavelmente envolvidas com quadros dismórficos. Para superar esta limitação, um método molecular que não envolve o cultivo celular e não requer conhecimento prévio da região genômica envolvida – a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array* CGH) – está despontando como uma ferramenta útil na citogenética molecular.

Considerando a utilidade clínica da técnica de *array* CGH, um estudo que avalie sua aplicabilidade em um grupo de fetos com malformações detectadas ultrassonograficamente e encaminhados para análise citogenética pode contribuir para o conhecimento das instabilidades genômicas submicroscópicas em fetos dismórficos, bem como auxiliar na condução destas gestações e no aconselhamento genético das famílias envolvidas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade da técnica de hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array* CGH) para o diagnóstico de perdas e ganhos genômicos em fetos dismórficos e com cariótipo convencional normal ou com alterações inconclusivas, em um laboratório de rotina de citogenética.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever os achados moleculares pela técnica de *array* CGH de ampla cobertura genômica em sangue de cordão de fetos dismórficos.
- Avaliar a habilidade da técnica de *array* CGH em confirmar ou acrescentar dados ao diagnóstico citogenético por bandamento G, com 450 a 550 pares de bandas por lote haplóide, em fetos dismórficos.
- Correlacionar os ganhos e as perdas genômicas encontradas com algumas malformações congênitas específicas.

3. Sujeitos e Método

3.1. Desenho do estudo e tamanho amostral

Estudo prospectivo descritivo. Para tanto, não foi calculado tamanho amostral mínimo.

3.2. Seleção de sujeitos, coleta das amostras e dos dados clínicos

Foram selecionados para o estudo fetos com pelo menos uma malformação detectada em ultrassonografia pré-natal e que apresentavam cariótipo pelo bandamento G, com resultado normal ou com suspeita de anomalias cromossômicas estruturais, admitidos no Programa de Medicina Fetal do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de março de 2007 a julho de 2009. Para fins deste estudo foram consideradas somente as malformações fetais maiores, definidas como defeitos congênitos que requerem intervenção médica ou cirúrgica e/ou acarretam significativo impacto funcional ou cosmético (101). Como segundo passo, dentro da amostra

inicial, foram selecionados os fetos que apresentavam malformações isoladas com maior suspeita de associação com fatores genéticos relacionados a amplificações ou deleções genômicas (17, 18) e fetos com múltiplas malformações.

Foram excluídos fetos cujas mães apresentavam suspeitas clínicas ou laboratoriais de doenças infecto-parasitárias, doenças metabólicas e história de uso de drogas ilícitas e álcool na gestação, a fim de minimizar possíveis influências de fatores teratogênicos e ambientais reconhecidos como fatores etiológicos de malformações fetais (102-104). Foram excluídos também os fetos com resultados não satisfatórios na cultura para o bandamento G (falhas de cultura) e os fetos cujas amostras sanguíneas falharam na obtenção de quantidade de DNA mínima necessária para a aplicação do método de CGH, mesmo após sua amplificação.

A coleta de amostra de sangue fetal foi realizada por cordocentese guiada por ultrassonografia no Setor de Ecografia do CAISM, e seguiram o protocolo de indicações e contra-indicações do procedimento de cordocentese do Setor de Medicina Fetal do CAISM. Para a técnica de CGH foi coletada uma amostra de sangue fetal em tubos com EDTA, em um volume que variou de 0,5ml a 3ml, dependendo da idade gestacional e de limitações técnicas no momento da cordocentese. Para os fetos que tiveram o estudo do cariótipo através da análise do líquido amniótico, a amostra sanguínea para o *array* CGH foi obtido através da punção do cordão umbilical no momento do nascimento. As amostras foram identificadas e encaminhadas para o Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular, pertencente aos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM, onde todos os passos laboratoriais descritos a seguir foram realizados.

Os dados clínicos incluídos no estudo foram obtidos nos prontuários médicos das gestantes e dos recém-nascidos. Foi realizada a investigação completa dos sinais dismórficos descritos nos laudos ultrassonográficos, e foram revistos os relatórios de avaliação clínica por neonatologistas e geneticistas clínicos, além de relatórios de necropsia nos casos em que o estudo anatomopatológico foi realizado. Os dados clínicos e laboratoriais foram registrados em uma ficha clínica preparada para a entrada dos dados deste estudo (ANEXO 1).

3.3. Técnicas, exames e testes

3.3.1. Preparação do DNA

O DNA genômico foi extraído e purificado a partir das amostras de sangue fetal através do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante para sangue total. Em seguida, a concentração e a pureza do DNA foram quantificadas por absorbância a 230, 260 e 280nm em um biofotômetro (BioPhotometer 6131, Eppendorf®, Hamburg, Germany).

A quantidade mínima de DNA necessária para a técnica de *array* CGH empregada é de 1µg em uma concentração de 40ng/µl. Duas amostras não atingiram estes requisitos e foram submetidas à amplificação direta pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de genoma completo (*Whole Genome Amplification* – WGA) utilizando-se para tal o GenomePlex® WGA2-kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), conforme protocolo do fabricante. Para estes casos, a amostra de referência utilizada no *array* CGH foi também amplificada.

3.3.2. Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array CGH)

A técnica de hibridização genômica comparativa baseada em *array* foi empregada utilizando-se o Constitutional Chip® 4.0 (PerkinElmer Inc., Turku, Finland). Esta plataforma contém 4890 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clones, distribuídos ao longo de todos os cromossomos humanos, com média de resolução de menos de 650Kb, marcados em duplicata. O número de clones analisados e a média de resolução de cada cromossomo estão listados na Figura 5. Neste total de 4890 BAC clones estão incluídos aproximadamente 900 clones para regiões subteloméricas e 100 clones para regiões pericentroméricas. A técnica seguiu o protocolo do fabricante e será descrita resumidamente a seguir.

Para cada experimento foram usados DNA extraído das amostras testadas (DNA teste) e DNA como controle normal (DNA de referência) (Promega® Corp., Madison, WI, USA). As amostras foram preparadas na concentração de 40ng/μl, em um volume final de 25μl.

O DNA teste foi marcado quimicamente, utilizando um tubo com cianina 3 (Cy3) e outro tubo com cianina 5 (Cy5). A mesma marcação foi realizada nos tubos contendo DNA de referência, totalizando quatro tubos para cada caso (dois pares de amostra/referência para cada caso em análise). Ao final da marcação, o DNA teste marcado com Cy5 foi precipitado juntamente com sua referência marcada com Cy3, e vice-versa (Figura 6). Cada par de amostra/referência foi hibridizado a 37°C em uma lâmina por 16 a 18 horas. A hibridização ocorreu de forma dupla para cada caso a fim de aumentar a exatidão dos resultados.

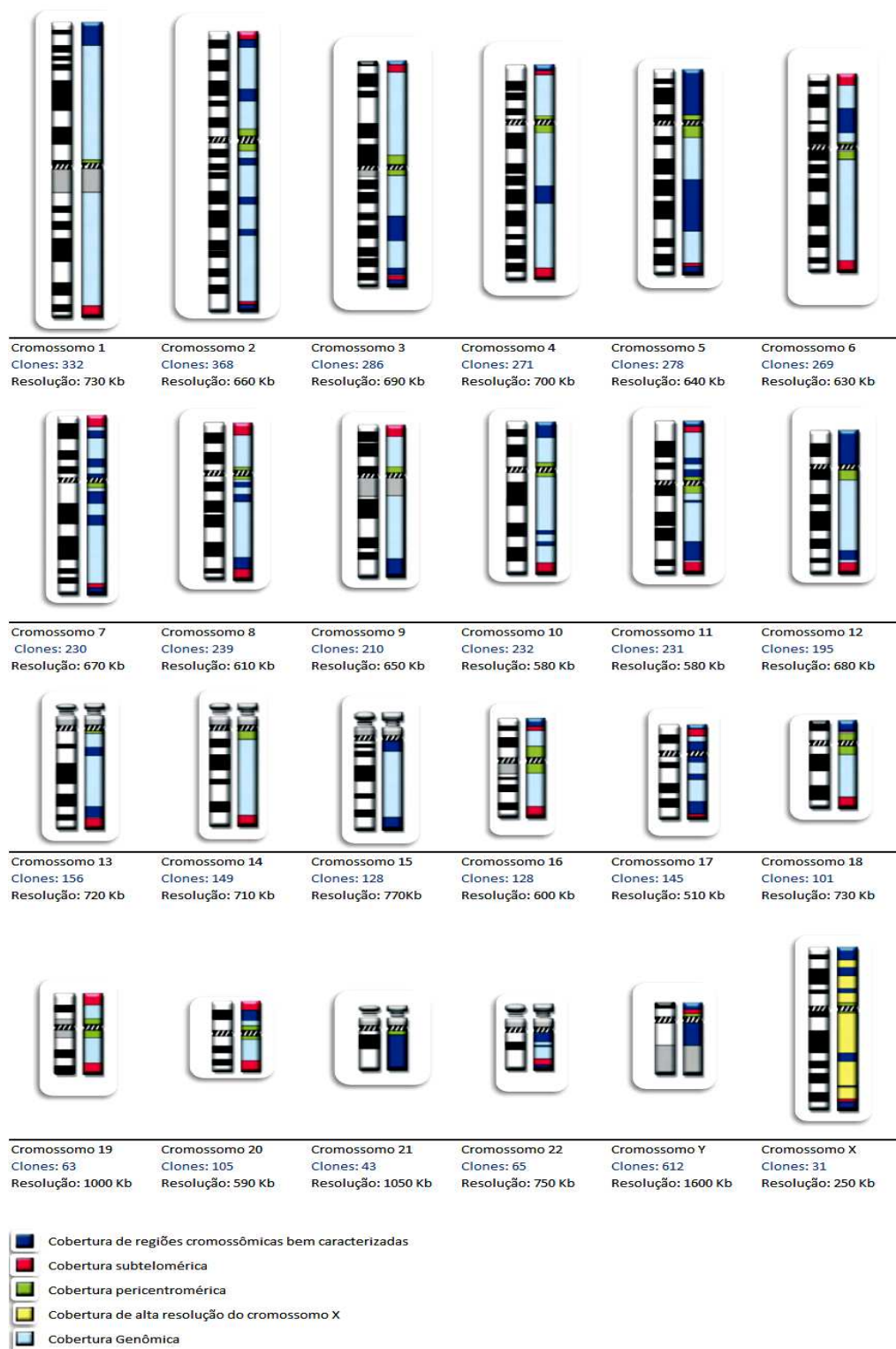
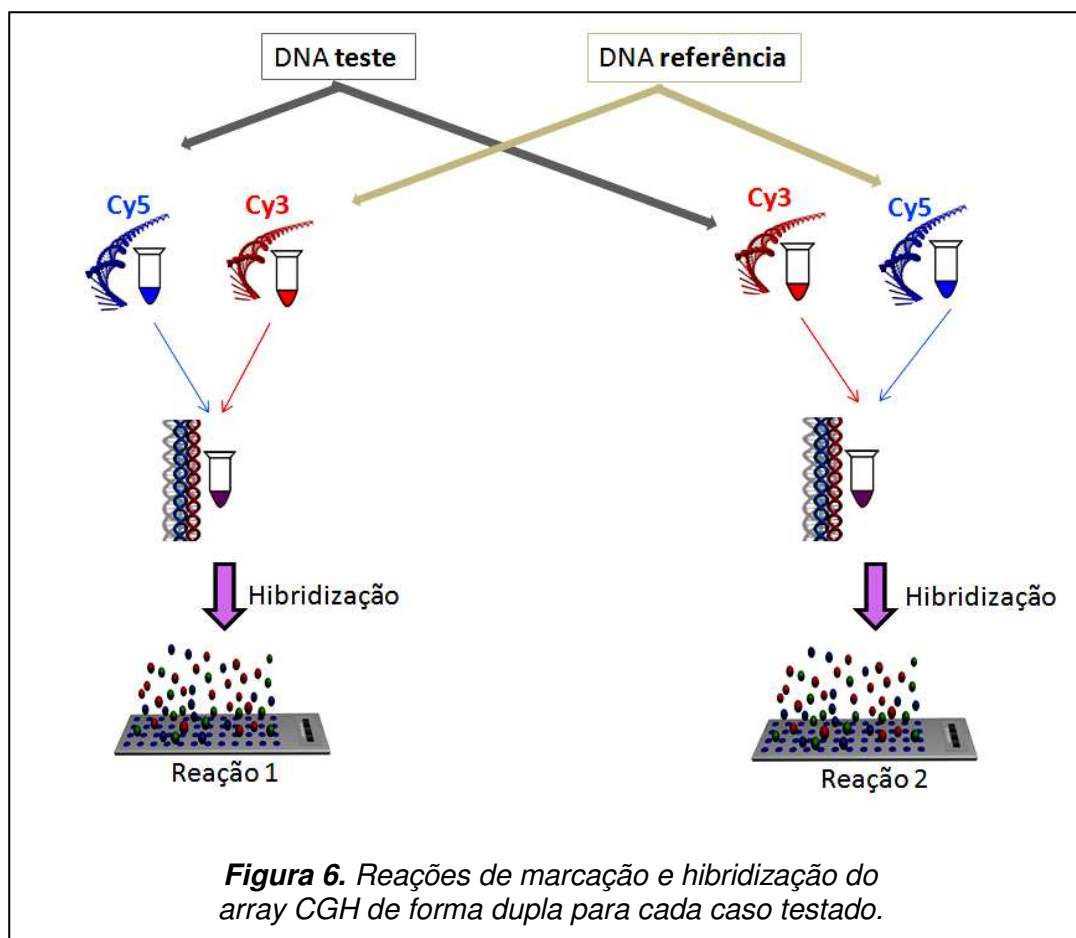


Figura 5. Número de clones analisados e média de resolução de cada cromossomo na plataforma de array CGH empregada.

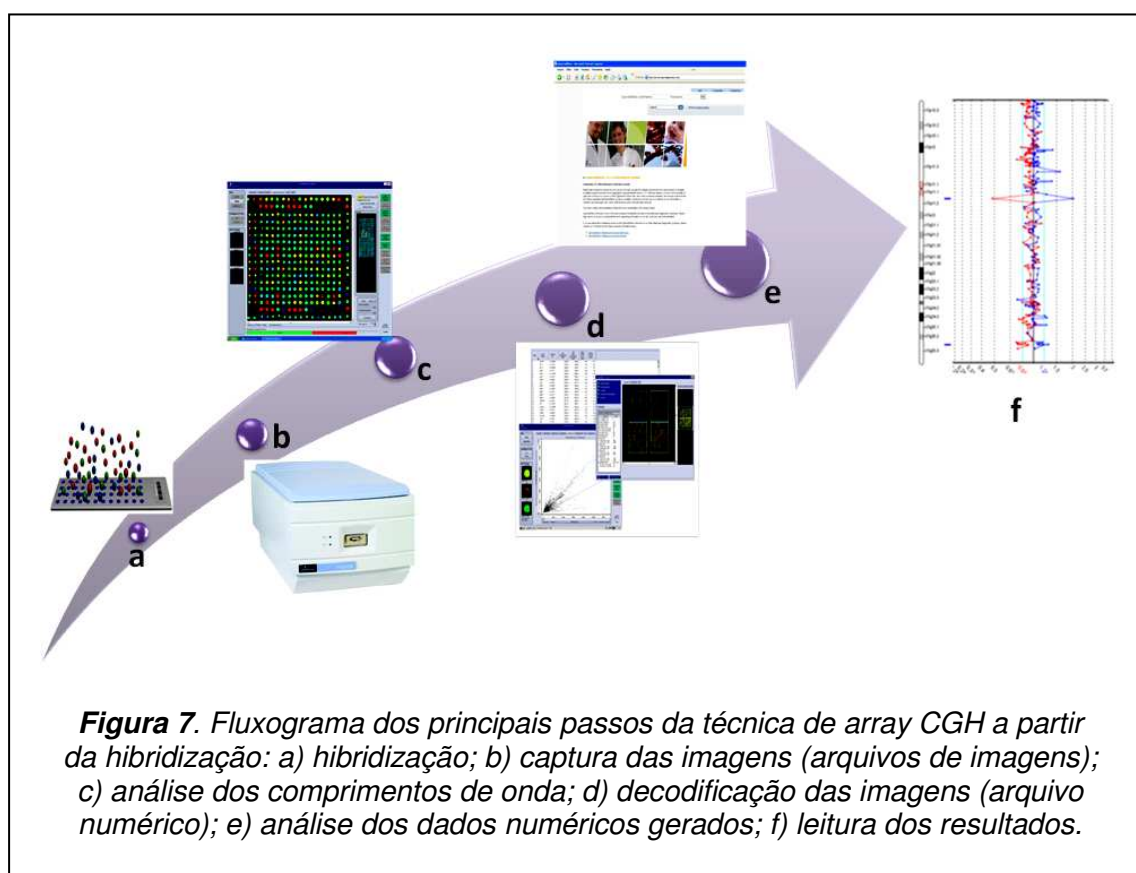


Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em três etapas com tampões (*Wash Buffer Pack, PerkinElmer Inc., Turku, Finland*) e escaneadas usando o GenePix® 4000B scanner (*Axon Instruments, Molecular Devices Corp.*) e ScanArray G_x (*PerkinElmer Inc.*). As imagens geradas foram importadas para programas específicos de análise das intensidades de fluorescência (*GenePix® Pro 6.0, Molecular Devices Corp.* e *ScanArray Express®, Microarray Analysis System 4.0.0.4*), onde foram quantificadas e transformadas em razões.

Em seguida, as médias das razões de intensidade de fluorescência das cianinas 3 e 5 para cada ponto na lâmina (*spot*) foram analisadas e normalizadas através de regressão linear (em uma escala $\log_2$) pelo programa *SpectralWare®*

v2.3.3 software (*PerkinElmer Inc.*) e marcadas em gráficos, de acordo com a localização específica de cada clone dentro do genoma. Os dados de cada par de amostra/referência foram combinados e comparados, determinando padrões de normalidade, ganho ou perda para cada clone. A Figura 7 apresenta de forma esquemática todas as etapas da técnica de *array* CGH utilizada.

O processamento pela técnica de *array* CGH foi realizado cronologicamente após o término das gestações.



3.4. Análise estatística, classificação e interpretação dos resultados

Os valores-limite de referência foram determinados pelo programa (SpectralWare® v2.3.3 software -PerkinElmer Inc.) usando os critérios “Iterative

2.5X Sigmas” e “Block Lowess”, considerando-se um intervalo de confiança de 99%. Os critérios de qualidade adotados para se considerar uma análise como satisfatória foram desvio padrão das razões de intensidade entre duplicatas do mesmo clone menos que 10% e valores de razões de intensidade adequados para análise em pelo menos 97,5% dos *spots* (77). Cada clone classificado como alterado pelo programa foi revisto pelo pesquisador e foram considerados para este estudo apenas os clones de regiões cromossômicas dos autossomos e que se mostraram alterados em relação à sua referência em ambas as duplicatas nas duas hibridizações (ou seja, nos quatro *spots* analisados para cada clone).

Em seguida, todos os clones considerados alterados foram submetidos à pesquisa da presença de variações do número de cópias (*copy number variation* – CNV) nos bancos de dados reconhecidos e disponíveis para consulta pública pela rede internacional de computadores (42, 43). Em seguida, todas as regiões cromossômicas representadas pelos clones alterados foram pesquisadas na literatura científica quanto à sua associação com o fenótipo apresentado pelo feto em questão (105-107).

Após esta análise, para cada caso, os clones considerados alterados foram classificados nos seguintes grupos:

- I. Alterações descritas: clones que não compreendem regiões de CNV conhecidas e que apresentam descrição na literatura científica pesquisada de pelo menos um caso de associação entre o fenótipo do feto estudado e a mesma alteração na região cromossômica (considerando-se banda e sub-banda) a que corresponde o clone.

- II. CNVs: clones cujas regiões cromossômicas compreendem, total ou parcialmente, pelo menos uma CNV descrita com a mesma alteração encontrada no caso.
- III. Alterações não descritas: clones que não compreendem regiões de CNV conhecidas e que não apresentam descrição na literatura científica pesquisada de associação entre o fenótipo do feto estudado e a região cromossômica a que corresponde o clone.

Alguns clones dos grupos II e III foram também selecionados para um quarto grupo, chamado de alterações de significado incerto, que inclui os seguintes critérios:

- IV. Alterações de significado incerto (critérios):
 - a. Clones presentes em pelo menos dois casos de fetos com o mesmo fenótipo.
 - b. Clones adjacentes (pelo menos dois clones).
 - c. Clones que compreendem regiões de CNV, mas apresentam descrição na literatura de associação entre o fenótipo presente no caso e sua região cromossômica.
 - d. Clones que apresentam associação descrita entre o fenótipo e sua região cromossômica, porém com alteração diferente da presente no caso (uma deleção no caso em questão e uma duplicação descrita, e vice-versa).
 - e. Clones que apresentam descrição na literatura de associação entre o fenótipo presente no caso e sua região cromossômica ao nível de resolução de banda, porém não de sub-banda (45).

Os clones alterados também foram analisados dentro dos grupos de malformações fetais, identificando-se clones e regiões cromossômicas recorrentes entre fetos com mesmo fenótipo. Os grupos de malformações específicas foram

compostos por fetos que apresentavam uma determinada malformação na sua forma isolada ou associada a outras malformações. Alguns fetos fizeram parte de mais de um grupo.

Em última análise, foram identificados os casos em que a técnica de *array* CGH permitiu um diagnóstico molecular que provocaria uma mudança no diagnóstico citogenético inicial com provável impacto clínico, incluindo-se aqui os casos em que houve implicações no prognóstico e aconselhamento genético.

3.5. Aspectos Éticos

Todas as gestantes cujos fetos foram selecionados para o estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2), previamente à coleta do sangue fetal. Para todos os fetos submetidos aos procedimentos de cordocentese ou amniocentese havia indicação clínica para a investigação invasiva, segundo protocolo do serviço. O material biológico não utilizado (excedente ou excluído) após o processamento, foi armazenado para pesquisas futuras, conforme as normas de armazenamento de material biológico humano no âmbito de projeto de pesquisa, dos Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM (ANEXO 3), com o consentimento prévio das gestantes, conforme consta no TCLE. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (ANEXO 4).

Para os casos com resultados considerados de impactos citogenético e clínico foram elaborados relatórios e encaminhados para estudos confirmatórios e aconselhamento genético.

4. Publicações

Artigo 1 – Prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q (q14→qter): phenotype, cytogenetics and molecular characterization through SKY and array CGH

Este artigo apresenta o estudo do feto com defeitos congênitos e cariótipo com alteração cromossômica estrutural não conclusiva.

Artigo 2 – Copy number imbalances in fetuses with congenital malformation and normal karyotype through a whole genome array CGH

Este artigo apresenta os resultados da avaliação molecular por array CGH dos 49 fetos incluídos neste trabalho com resultado de cariótipo normal.

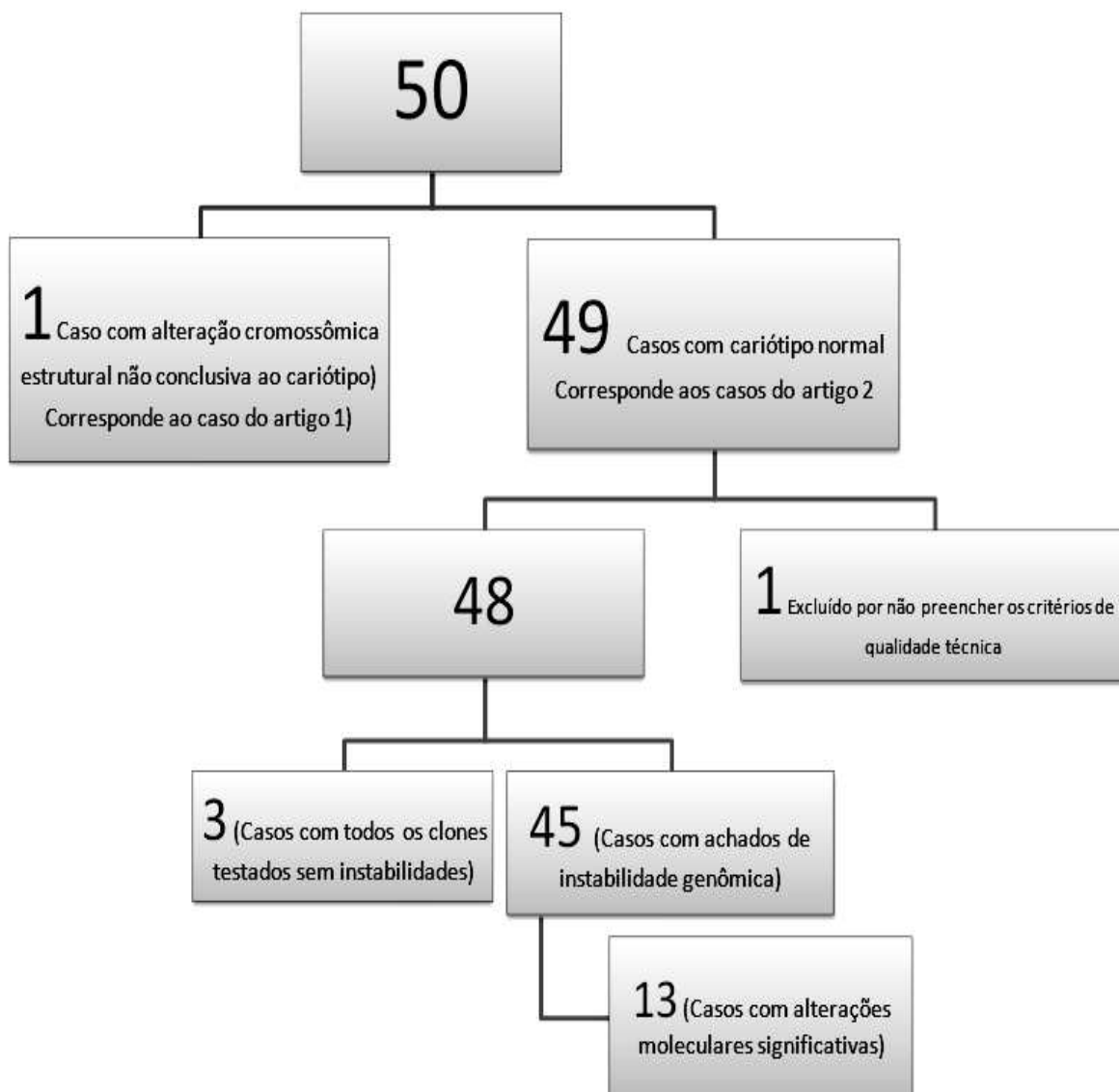
Artigo 3 – Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly

Este artigo apresenta a discussão detalhada da avaliação molecular por array CGH do grupo de fetos portadores de holoprosencefalia e cariótipo normal incluídos nesta pesquisa.

Artigo 4 – Prenatal diagnosis of copy number imbalances in fetuses with congenital diaphragmatic hernia

Este artigo apresenta a discussão detalhada da avaliação molecular por array CGH do grupo de fetos portadores de hérnia diafragmática congênita e cariótipo normal incluídos nesta pesquisa.

FLUXOGRAMA DOS RESULTADOS OBTIDOS



4.1. Artigo 1



Ribeirão Preto, 2 de dezembro de 2009.

Prezada Profa. Dra. Isabela Nelly Machado,

O artigo **"Prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q (q14→qter): phenotype, cytogenetics and molecular characterization through SKY and array CGH"**, GMR 716, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research*. E tem publicação prevista para o volume 9, número 1, 2010.

Aproveito a oportunidade para solicitar o pagamento da taxa de R\$ 800,00 referente aos custos de publicação do respectivo artigo (GMR 716). Ratifico que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Dados para pagamento via depósito bancário:

Banco do Brasil

ag. 3312-x c/c 160.314-0

a favor de Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto

Assim que o depósito for efetivado, favor nos mandar o comprovante de pagamento, por e-mail (gmr@funpecrp.com.br) ou fax (16) 3621-1991, identificando com o número do artigo **GMR 716**. Se necessário, emitiremos nota fiscal. Para tal, favor nos envie os dados: nome/instituição, endereço de envio e emissão, CPF/CNPJ, Inscrição Estadual - empresa.

A GMR está indexadas em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI - os mais importantes indexadores da área biológica.

Contando com sua compreensão, agradecemos.

Atenciosamente,

Francine Muniz

Coordenadora editorial (Mtb 44.300)

Genetics and Molecular Research

www.funpecrp.com.br/gmr

Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

Title: Prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q (q14→qter): phenotype, cytogenetics and molecular characterization through SKY and array CGH.

Running title: Prenatal diagnosis of partial trisomy 13q

Authors: Isabela Nelly Machado^{a,b}, Juliana Karina Heinrich^a, Cassia Campanhol^a, Raquel Mary Rodrigues-Peres^a, Fábio Morato de Oliveira^c, Ricardo Barini^b

Institution:

^aLaboratório de Cultivo Celular e Citogenética do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^bPrograma de Medicina Fetal, Divisão de Obstetrícia, Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^cDepartamento de Clínica Médica, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Corresponding author: Isabela Nelly Machado.

Departamento de Tocoginecologia da FCM - Unicamp.

Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher- CAISM.

Rua Alexander Fleming, 101. Campinas, SP, Brasil. - 13083-970.

Fone-Fax: 55 - 19 – 3521-9336.

E-mail: imachado@fcm.unicamp.br

Abstract:

Partial trisomy 13q is an uncommon chromosomal abnormality with a variable phenotypic expression. We report a prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q in a fetus with partial agenesis of the cerebellar vermis, partial agenesis of the callosum corpus, hydrops and polyhydramnios. The morphological features at prenatal ultrasound, on clinical examination immediately after birth, and at postmortem evaluation were described. G-banding karyotyping, SKY and array CGH analysis of fetal blood were performed. The cytogenetic result on fetal blood was 46,XX,add(4)(q28). The parental karyotypes were normal. A girl was delivered at 34 weeks gestation and died within 2 h. An autopsy confirmed all the prenatal findings and also showed agenesis of the diaphragm. Spectral karyotyping (SKY) identified the additional material's origin as being from chromosome 13. Array-CGH was carried out and showed amplification of distal regions of the long arm of chromosome 13 from region 13q14 to qter. This is the first report of a fetus with molecular characterization of a partial trisomy 13q (q14→qter), present as *de novo* unbalanced translocation at chromosome 4q. Our results confirm the usefulness of molecular characterization of malformed fetuses for prenatal diagnosis and counseling. Also, they emphasize the importance of parental karyotyping.

Key words: Partial trisomy 13q; Prenatal diagnosis; Array comparative genomic hybridization; SKY; Hydrops; Dandy-Walker malformation; Corpus callosum agenesis; Diaphragm agenesis.

Introduction

Partial trisomy 13q is an uncommon chromosomal abnormality, with no well-determined frequency. It has been described as having a variable phenotypic expression. It may result from parental reciprocal translocations, parental pericentric inversions (Chen et al., 2005) or *de novo* direct duplications (Hall et al., 2007).

We present a case of a partial trisomy 13q prenatally diagnosed on fetal blood, initially detected as a chromosome 4 with an extra genetic material on the long arm and subsequently confirmed to be 13q material with spectral karyotyping (SKY) and array comparative genomic hybridization (aCGH).

Clinical report

A 19-year-old primigravida woman was referred for prenatal diagnosis and genetic counseling at 28 weeks gestation because of an abnormal sonogram that revealed Dandy-Walker malformation and subcutaneous edema. The sonographic evaluation in our tertiary fetal medicine center showed a single fetus with partial absence of the cerebellar vermis (Dandy-Walker malformation variant) with an enlarged cisterna magna, partial agenesis of the callosum corpus, hydrops and polyhydramnios. The fetus's heart was morphologically normal at fetal echocardiography. The fetal growth rate was normal for the gestational age.

There was no family history of congenital malformations or genetic disorders. Both woman and her husband were healthy and nonconsanguineous. The mother was tested negative for toxoplasma, parvovirus B19, CMV, herpes and rubella. Maternal diabetic screening was negative. No atypical antibodies were found in her blood. A cordocentesis was performed at 29 weeks gestation for karyotyping, and the parents gave informed consent for further studies with the fetus blood.

Spontaneous labor began at 34 weeks gestation. A girl was delivered with a birth weight of 3135 g (above 90th percentile), and Apgar scores of 1 and 1 at 1 minute and 5 minutes respectively. The newborn presented with bradycardic (66 bpm), cyanosis, hydropsy, hypotony, akinesia and abdomen distension. She died after 2 hours of life.

Neonatal evaluation revealed some dysmorphic features: short neck, low-set ears, nasal bridge hypoplasia, camptodactyly (5th finger at right hand, 4th and 5th fingers at left hand), clinodactyly (4th and 5th fingers, bilateral), and thin umbilical cord.

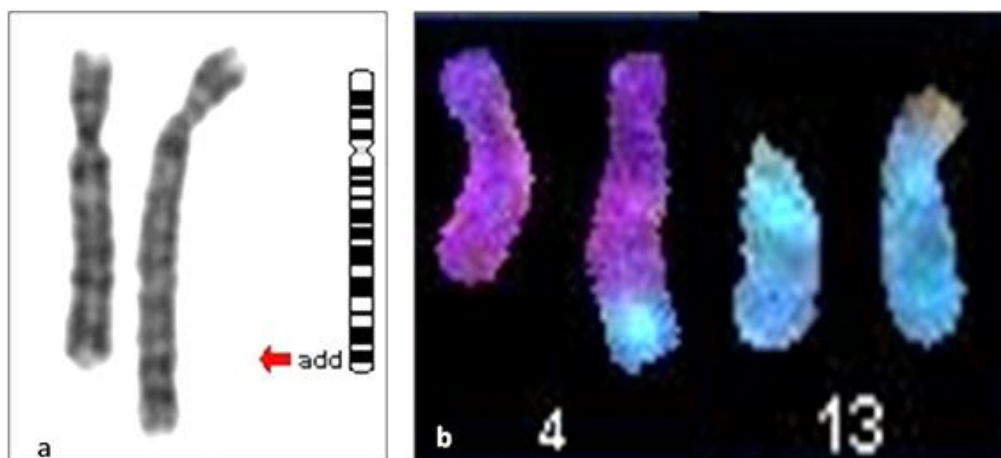
An autopsy confirmed the prenatal findings of agenesis of the callosum corpus (total) and generalized hydrops. Additional findings were agenesis of the diaphragm and severe pulmonary hypoplasia.

Genetic analysis

Routine cytogenetic analysis of the fetal blood using G-banded metaphase chromosomes at approximately the 500-band level was performed. Extra material of unknown origin attached to band q28 at chromosome 4 was revealed in twenty metaphase spreads studied (Figure 1a). The cytogenetic result was assigned as 46,XX,add(4) (q28). The parental karyotypes performed on lymphocytes were normal.

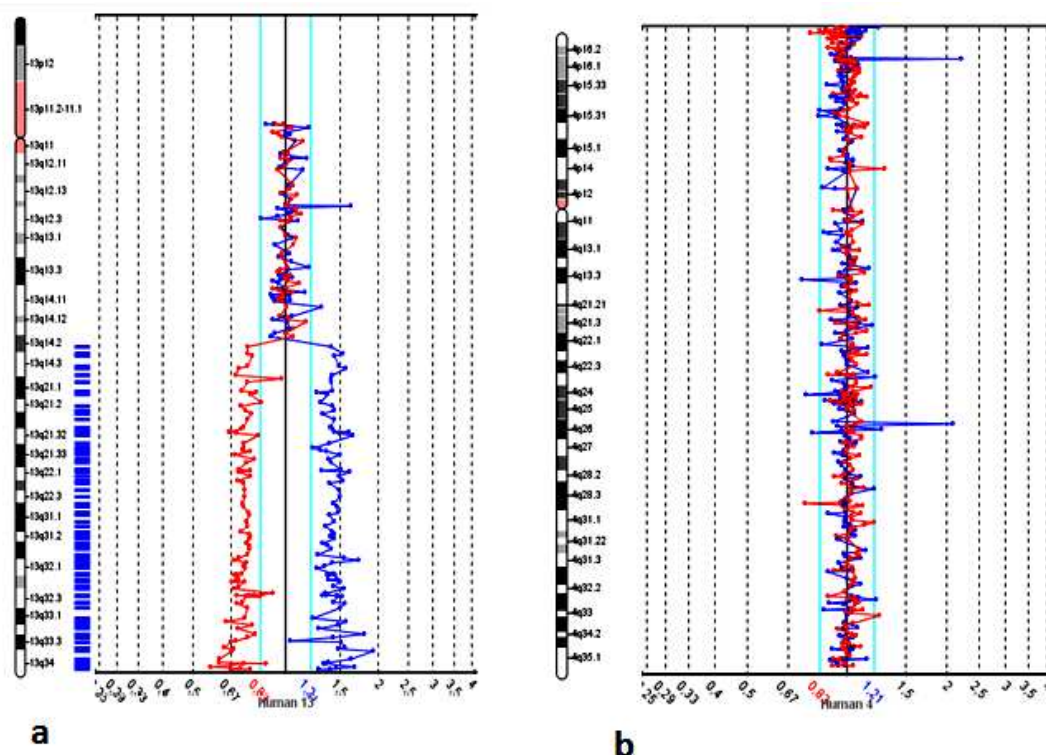
Images produced by spectral karyotyping -SKY (Applied Spectral Imaging, Inc., Vista, CA, USA) identified the additional material's origin as being from chromosome 13 (Figure 1b). In order to further characterize and refine the size of the translocated segment of chromosome 13, array comparative genomic hybridization was carried out using the Constitutional Chip® 4.0 (PerkinElmer Inc., Turku, Finland), comprised of approximately 5000 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clones, covering the whole human genome with an average resolution of ~ 650 kb and spotted in duplicate. This molecular technique showed copy number gain of 89 BAC clones on the distal regions of the long arm of chromosome 13, from region 13q14 to the terminal segment, with no apparent loss of 4q and 13q material (Figure 2a and 2b). The proximal breakpoint was located in clone RP11-142D16 (region 13q14.3-13q21.31, mapping 58.98 Mb).

Figure 1. **a** G-banded normal and derivative chromosome 4 from the fetus. **b** Metaphase spread painted for chromosomes 4 and 13 demonstrating the additional material's origin as being from chromosome 13.



Therefore, based on the knowledge gained from these molecular results, the karyotype of the fetus was reassigned as 46,XX,der(4)t(4;13)(q28;q14).arr 13q14qter(58,974,200-114,005,800)x3 dn.

Figure 2. Array CGH spectral view of chromosome 13 (a) and 4 (b) of the fetus (Constitutional Chip 4.0).



Discussion

To our knowledge, this is the first report of a prenatal diagnosis with molecular characterization of a partial trisomy 13q (q14→qter) presented as *de novo* direct duplication structurally rearranged at chromosome 4q.

Clinical features seem to be distinctive between the trisomy of the proximal and distal regions of the long arm of chromosome 13 (Tharapel et al., 1986). Partial trisomy 13q has been shown to have both a distinctive (Tharapel et al., 1986) and common (Nikolis et al., 1991) phenotype resembling that of complete trisomy 13. The fetus presented here does not show characteristic trisomy 13 major features. Although the association of congenital diaphragmatic hernia (CDH) and trisomy 13 has been described, complete bilateral agenesis of the diaphragm is a rare CDH variant with no previously described chromosomal aberration etiology.

The published cases of partial trisomy 13q helped to delineate the variable phenotype associated with this chromosomopathy (Rivas et al., 1984; Tharapel et al.,

1986; Nikolis et al., 1991; Alba et al., 1999; Chen et al., 2005; Lin et al., 2007; Ribacoba et al., 2008). Common phenotypic features described for partial trisomy 13q are: craniofacial dysmorphism (bushy eyebrows, long curled eyelashes, prominent nasal bridge, long philtrum, thin upper lip, microcephaly and hypotelorism), highly arched palate, short neck, hemangioma, hexadactyly, urinary tract/kidney anomalies, umbilical/inguinal hernia, intra-uterine growth retardation, and oligohydramnios. Other phenotypic features in child and adult patients are: psychomotor retardation, hypoacusia, hypochromic anemia, splenomegaly, ocular anomalies, convulsions and fatty acid disturbances.

This present case involves a trisomy for distal approximate three-quarters of 13q (q14→qter). The proband neonate shares a few characteristic defects with the described ones, such as short neck and low-set ears.

The association of the abnormal sonographic findings noted in the present case (hydrops, agenesis of the callosum corpus and Dandy-Walker malformation) did not correlate with other features previously described in cases involving partial trisomy 13q. This inconsistent phenotype has already been mentioned even when the same region is in trisomy (Tharapel et al., 1986). Even isolated, the abnormal findings have a poor correlation with partial trisomy 13, as noted in the following discussion.

The percentage of chromosomal abnormalities in cases with nonimmune hydrops fetalis has a large range in the recent literature, from 10 to 78% (Russel et al., 2008). The association of fetal hydrops and trisomy 13 as in the present case is rare (Greenberg et al., 1983; Landrum et al., 1986), and in a recent review of 434 fetuses with subcutaneous edema, the authors did not find such association (Beke et al., 2009). Although no loss was found in the present case at chromosomes 4 and 13 breakpoints, the association between terminal 4q deletion and severe hydrops has already been described (Mitchell et al., 1981; Russel et al., 2008). Also, fetal ascites has been described in a case of combination of partial trisomy 13 (13pter-13q12.3) due to maternal reciprocal translocation (Chen et al., 1999).

Our proband fetus presented with digital malformations at birth, supporting the current hypothesis that the band 13q32 contains critical genes for digit formation (Brown et al., 1993).

In relation to the structural defects in the central nervous system and the association with partial trisomy 13, three fetuses with enlarged magna cisterna (Nyberg et al., 1991)

and one child with corpus callosum agenesis (Marszal et al., 2000) have been published, indicating a possible phenotype-genotype association. Applying a 244k oligonucleotide-based array-CGH, candidate chromosomal regions associated with the Dandy-Walker malformation and agenesis of the callosum corpus were recently delineated as deletions in the 13q32.2-q33.1 and 13q32.3-q33.1, respectively (Kirchholff et al., 2009). Differently, our fetus showed duplication in these regions.

Parental karyotype was assessed, and due to the excellent banding pattern and high banding resolution, we found no need to perform array CGH analysis on these samples. After karyotype analysis of twenty metaphase spreads we could confidently assign normal karyotypes to both parents and indicate that the finding was not inherited but a *de novo* genomic imbalance.

The majority of trisomy 13q cases (>90%) are from maternal origin (Hall et al., 2007), typically due to errors in meiosis I, as in other autosomal trisomies. Many cases are from parental balanced translocations, typically as pericentric inversions. Few cases were described resulting from unequal crossing-over of a paternal pericentric inversion, including trisomy 13q21→qter from paternal inv(13)(p11q21) (Bourthoumieu et al., 2004), trisomy 13q22→qter from paternal inv(13)(p11q22) (Williamson et al., 1980) and trisomy 13q14.1→qter from paternal inv(13)(p12q14.1) (Chen et al., 2005). One case was described resulting from a paternal translocation involving chromosome Y (46,X,der(Y),t(Yq;13q)pat (Nikolis et al., 1991). Partial trisomy 13q (q14→qter) resulting from a *de novo* duplication, as presented in this case, is very unusual [Rao et al., 1995; Chen et al., 2005) and such a partial trisomy involving an unbalanced translocation at chromosome 4 was not found in the consulted literature. Table 1 summarizes some of the structurally rearranged chromosome involved with duplication of chromosome 13q.

As the number of fetuses with this particular condition is not sufficient to define a characteristic prenatal phenotype-genotype correlation, this case with simple duplication of the 13q here presented can contribute for a more precise clinical correlation. The success and accuracy of such correlation depend upon the analysis of sufficient large number of patients with complete phenotypic malformations and molecular description of identical chromosome aberrations.

The molecular characterization of malformed fetuses is important for prenatal diagnosis and counseling. Array CGH successfully identified the additional genetic material origin, with its precise location and size, but it cannot describe the specific chromosome organization. This molecular diagnosis can be completed in timely manner, making it particularly suitable for prenatal proposes. Thus, the present case also emphasizes that array CGH may not replace karyotype analysis, but it can complement and extend current methods for a precise prenatal diagnosis and characterization of syndromes.

Acknowledgments: We thank Dr. Rilde Plutarco R. L. Veríssimo for postmortem evaluation of the fetus and Christopher Williams (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) for specialized technical assistance. Research supported by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant No. 2007/04684-0).

Table 1. Structurally rearranged chromosomes involved with duplication of 13q.

13q duplicated region	Other chromosome region involved	Author and year
q32-qter	1q	Rao et al., 1995 [21]
q22	3p26	Bonioli et al., 1981 [23]
q22-qter	5p	Alba et al., 1999 [6]
q22-qter	5p15	Ribacoba et al., 2008 [8]
q12	6p24	Jones et al., 1979 [24]
q14-qter	7qter	Martin-Lucas et ., 1982 [25]
pter-q12	8p23	Lukusa et al., 1999 [26]
q22-qter	8p	Chen et al., 2005 [22]
q21	9p21	Jotterand and Juillard, 1976 [27]
q22	15q26	Rivas et al., 1984 [5]
pter-q12.3	16p	Chen et al., 1999 [14]
q22	18q23	Chu et al., 1994 [28]
q22-qter	18q23	Yu et al., 1995 [29]
q22-qter	18q	Cekada et al., 1999 [30]
q34	21p13	Di Bella et al., 2006 [31]
q	Xq	Dries et al., 2003 [32]
q14	Yq12	Nikolis et al., 1991 [4]
q21-qter	6q21 and 18q22	Quadrelli et al., 2009 [33]

References:

- Alba MR, Sanz R, Lorda-Sanchez I, Fernández-Moya JM, et al. (1999) Segregation of digital number with partial monosomy or trisomy of 13q in familial 5;13 translocation. *Prenat Diagn.* 19:884-6.
- Beke A, Joó JG, Csaba A, Lázár L, et al. (2009). Incidence of chromosomal abnormalities in the presence of fetal subcutaneous oedema, such as nuchal oedema, cystic hygroma and non-immune hydrops. *Fetal Diagn Ther.* 25(1):83-92.
- Bonioli E, Crisalli M, Monteverde R, Vianello MG (1981). Karyotype-phenotype correlation in partial trisomy 13. Report of a case due to maternal translocation. *Am J Dis Child.* 135(12):1115-7.
- Bourthoumieu S, Esclaire F, Terro F, Fiorenza M, et al. (2004). Two unusual chromosomal aberrations ascertained by sonographic anomalies. *Prenat Diagn.* 24:219-23.
- Brown S, Gersen S, Anyane-Yeboah K, Warburton D (1993). Preliminary definition of a “critical region” of chromosome 13 in q32: report of 14 cases with 13q deletions and review of the literature. *Am J Med Genet.* 45:52-9.
- Cekada S, Kilvain S, Brajenovic-Milic B, Brecevic L, et al. (1999). Partial trisomy 13q22→qter and monosomy 18q21→qter as a result of familial translocation. *Acta Paediatr.* 88:675-8.
- Chen CP, Chern SR, Hsu CH, Lee CC, et al. (2005). Prenatal diagnosis of de novo partial trisomy 13q (13q22→qter) and partial monosomy 8p (8p23.3→pter) associated with holoprosencephaly, premaxillary agenesis, hexadactily, and a hypoplastic left heart. *Prenat Diagn.* 25:331-7.
- Chen CP, Chern SR, Lee CC, Town DD, et al. (1999). Bilateral renal agenesis and fetal ascites in association with partial trisomy 13 and partial trisomy 16 due to a 3:1 segregation of maternal reciprocal translocation t(13;16)(q12.3;p13.2). *Prenat Diagn.* 19:783-6.

Chen CP, Lin SP, Lee CC, Chen WL, et al. (2005). Perinatal findings of partial trisomy 13q (13q14.1→qter) resulting from paternal pericentric inversion of chromosome 13. *Prenat Diagn.* 25:516-28.

Chu TW, Teebi AS, Gibson L, Breg WR, et al. (1994). FISH diagnosis of partial trisomy 13 and tetrasomy 13 in a patient with severe trigonocephaly (C) phenotype. *Am J Med Genet.* 52(1):92-6.

Di Bella MA, Calì F, Seidita G, Mirisola M, et al. (2006). Screening of subtelomeric rearrangements in autistic disorder: identification of a partial trisomy of 13q34 in a patient bearing a 13q;21p translocation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141B(6):584-90.

Dries D, Baca K, Truss L, Dobin S (2003). Interstitial deletion of 13q and a 13;X chromosome translocation results in partial trisomy 13 and bilateral retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* 24(3):175-80.

Greenberg F, Carpenter RJ, Ledbetter DH (1983). Cystic hygroma and hydrops fetalis in a fetus with trisomy 13. *Clin Genet.* 24(5):389-91.

Hall HE, Chan ER, Collins A, Judis L, et al. (2007). The origin of trisomy 13. *Am J Genet A.* 143:2242-8.

Jones LA, Taysi K, Strauss AW, Hartmann AF (1979). Partial trisomy 13 as a result of de novo (6p;13q) translocation. *Hum Genet.* 27;48(2):245-9.

Jotterand M, Juillard E (1976). A new case of trisomy for the distal part of 13q due to maternal translocation, t(9;13)(p21;q21). *Hum Genet.* 33(3):213-22.

Kirchhoff M, Bisgaard AM, Stoeva R, Dimitrov B, et al. (2009). Phenotype and 244k array-CGH characterization of chromosome 13q deletions: an update of the phenotypic map of 13q21.1-qter. *Am J Med Genet A.* 149A(5):894-905.

Landrum BG, Johnson DE, Ferrara B, Boros SJ, et al. (1986). Hydrops fetalis and chromosomal trisomies. *Am J Obstet Gynecol.* 154(5):1114-5.

Lin HY, Lin SP, Chen YJ, Hsu CH, et al. (2007). Clinical characteristics and survival of trisomy 13 in a medical center of Taiwan, 1985-2004. *Pediatr Int.* 49: 380-6.

Lukusa T, van den Berghe L, Smeets E, Fryns JP (1999). Proximal trisomy 13q and distal monosomy 8p in a dysmorphic and mentally retarded patient with an isodicentric chromosome 13q and 13q/8p translocation chromosome. *Ann Genet.* 42(4):215-20.

Marszał E, Jamroz E, Pilch J, Kluczevska E, et al. (2000). Agenesis of corpus callosum: clinical description and etiology. *J Child Neurol.* 15(6):401-5.

Martin-Lucas MA, Pérez-Castillo A, Abrisqueta JA, de Torres ML, et al. (1982). Partial trisomy 13 due to maternal translocation t(7;13)(p22q14). *Ann Genet.* 25(3):172-8.

Mitchell JA, Packman S, Loughman WD, Fineman RM, et al. (1981). Deletions of different segments of the long arm of chromosome 4. *Am J Med Genet.* 8:73-89.

Nikolis J, Ivanovic K, Diklic V (1991). Partial trisomy 13q resulting from a paternal reciprocal Yq;13q translocation. *J Med Genet.* 28:425-6.

Nyberg DA, Mahony BS, Hegge FN, Hickok D, et al. (1991). Enlarged cisterna magna and the Dandy-Walker malformation: factors associated with chromosome abnormalities. *Obstet Gynecol.* 77(3): 436-42.

Quadrelli R, Quadrelli A, Milunsky A, Zou YS, et al. (2009). A 14-year follow-up of a case detected prenatally of partial trisomy 13q21.32-qter and monosomy 18q22.3-qter as a result of a maternal complex chromosome rearrangement involving chromosomes 6, 13, and 18. *Genet Test Mol Biomarkers.* 13(3):387-93.

Rao VV, Carpenter NJ, Gucsavas M, Coldwell J, et al. (1995). Partial trisomy 13q identified by sequential fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet.* 58:50-3.

Ribacoba R, Menendez-Gonzalez M, Hernando I, Salas J, et al. (2008). Partial trisomy 13q22-qter associated to leukoencephalopathy and late onset generalised epilepsy. *Int Arch Med.* 1:5.

Rivas F, Rivera H, Plascencia ML, Ibarra B, et al. (1984). The phenotype in partial 13q trisomies, apropos of a familial (13;15)(q22;q26) translocation. *Hum Genet* 1984; 67:86-93.

Russel Z, Kontopoulos EV, Quintero RA, DeBauche DM, et al. (2008). Prenatal diagnosis of a 4q33-4qter deletion in a fetus with hydrops. *Fetal Diagn Ther*. 24:250-3.

Tharapel SA, Lewandowski RC, Tharapel AT, Wilroy Jr S (1986). Phenotype-karyotype correlation in patients trisomic for various segments of chromosome 13. *J Med Genet*. 23:310-5.

Williamson EM, Miller JF, Seabright M (1980). Pericentric inversion (13) with two different recombinants in the same family. *J Med Genet*. 17:309-12.

Yu J, Wu JM, Lin SJ, Tzeng CC (1995). Congenital isolated absence of pulmonary valve in a neonate with partial trisomy 13q. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 36(3):214-6.

4.2. Artigo 2

Isabela Nelly Machado

De: fdt@karger.ch
Enviado em: quarta-feira, 10 de fevereiro de 2010 16:00
Para: imachado@fcm.unicamp.br
Assunto: Fetal Diagnosis and Therapy Submission Received
Anexos: _AVG certification_.txt

Dear Dr. Isabela Machado:

Thank you for submitting your manuscript to "Fetal Diagnosis and Therapy"; the submission number is: 4408. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: fdt@karger.ch.

With kind regards,

Editorial Office

Title: Copy number imbalances in fetuses with congenital malformation and normal karyotype through a whole genome array CGH

Short title: Copy number imbalances in malformed fetuses by array CGH

Authors: Isabela Nelly Machado, Juliana Karina Heinrich, Ricardo Barini.

Institution: Cell Culture and Cytogenetics Laboratory, Fetal Medicine Program of the Integral Assistance for Women's Health (CAISM) of the Department of Obstetrics and Gynecology. Faculty of Medical Sciences. State University of Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author:

Isabela Nelly Machado

Rua Alexander Fleming, 101. Cidade Universitária. UNICAMP

Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Tel/Fax: 55 19 3521 9304

Email: imachado@fcm.unicamp.br

Abstract:

Objective: Our aim was to describe the molecular analysis through array comparative genomic hybridization (array CGH) in a group of fetuses with sonographically diagnosed anomalies and normal metaphase karyotype.

Methods: A whole genome BAC-array based CGH was carried out in fetal blood samples. All cytogenetic alterations were matched against the known CNV databases and tested for published clinical correlation.

Results: The array CGH analysis showed loss or gain in 45 out of the 48 studied fetuses (93.7%), including one complete trisomy, with a total of 406 copy number imbalances, 184 (45.3%) at described copy number variations (CNV) regions. For 165 clones (40.7%) there was neither correlation with CNVs nor with reported clinical correlation in the literature. The chromosome 4 and chromosome 15q11.2 region were most commonly affected. There were complete correlation between the chromosomal alteration and the fetus defect in 16 fetuses (33.3%). Thirteen out of the total of 48 fetuses (27%) showed 12 deletions and 3 duplications that lead to cytogenetic diagnosis with clinical impact.

Conclusion: Our results may contribute to verify the effectiveness and applicability of the molecular technique of array CGH for prenatal diagnosis purposes, and also to elucidate the submicroscopic genomic instability of malformed fetuses with normal metaphase karyotype.

Keywords: prenatal diagnosis, array comparative genomic hybridization, fetal abnormalities, genetic pathways, molecular biology.

Introduction

Karyotype analysis of cultured cells has proved to be highly reliable to identify chromosome copy number abnormalities such as aneuploidies and large structural rearrangements, and it is considered the gold standard for prenatal diagnosis. On the other hand, it is time and labor consuming; besides the cell culture failure is still a major issue to be overcome. Array-based comparative genomic hybridization (array CGH) is a recent comprehensive genome-wide screening strategy for detecting DNA copy number imbalances in a fast, non-dependent of known chromosomal regions involved as the FISH techniques, and with a much higher resolution than karyotype banding analysis. In this manner, array

CGH has the potential to be used for prenatal diagnosis, addressing many of the limitations of both conventional and molecular strategies current available.

The aim of this study was to describe the molecular analysis through a whole genome array comparative genomic hybridization in a group of fetuses with sonographically diagnosed anomalies and normal metaphase karyotype, in an attempt to improve the knowledge of the submicroscopic abnormalities presented in these malformed fetuses.

Methods

Patients and samples

This study was carried out prospectively during a 19-month period (from January 2008 to July 2009), after the protocol approval by the institution's ethical committee. The inclusion criteria consisted of fetuses with an ultrasound diagnosis of at least one major abnormalities and normal G-banding karyotype. Among the consecutive fetuses that fulfilled these inclusion criteria, we selected fetuses with single congenital defects strongly suspected to be related to genomic amplification and deletion; and fetuses with multiple congenital anomalies (MCA). The fetal karyotype analysis was performed using G-banded metaphase chromosomes at approximately the 400-500-band level.

Fetal samples were collected by cordocentesis at different week's gestation for karyotype and for this research, according to the guidelines of the Fetal Medicine Program of the Center for Integral Assistance for Women's Health of the State University of Campinas (Unicamp). When the fetus karyotype was performed on the amniotic fluid, the fetal blood sample was collected from the umbilical cord at the delivery time. All parents gave written informed consent before testing.

Clinical data were obtained through the medical records. Besides demographic characterization, it included the complete findings from antenatal ultrasound recorded, the babies' features observed through clinical examination by a neonatologists and a geneticists after birth, the cytogenetic results and autopsy findings.

Molecular study:

Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to

manufacturer's protocol for whole blood. For two samples, fetal DNA and reference DNA were amplified by whole genome amplification (WGA) using GenomePlex® WGA2-kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), according to manufacturer's instructions. DNA concentration and quality were estimated using a biophotometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf®, Hamburg, Germany).

Array Comparative Genomic Hybridization was carried out using the commercially available Constitutional Chip® 4.0 (PerkinElmer Inc., Turku, Finland), composed of 4890 bacterial artificial chromosome (BAC) clones, covering the whole human genome with an average resolution of < 650 kb and spotted in duplicate.

For each experiment, a normal reference DNA (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. An equal amount of normal reference DNA was amplified in parallel with test DNA for the two WGA amplified cases. All experiments included dye reversal and two array hybridizations to eliminate any experimental bias caused by Cy-dyes and to obtain an accurate ratio. The labeling and hybridization steps involved reagents supplied by the array manufacturer (PerkinElmer Inc., Turku, Finland). The labeled DNA was hybridized to Constitutional Chip® 4.0 at 37°C for 16-18 hours.

Data analysis and interpretation:

After post-hybridization washes, slides were scanned, and captured TIFF images were analyzed by either the GenePix® Pro 6.0 (Molecular Devices Corp.) or the ScanArray Express® (Microarray Analysis System 4.0.0.4) software. After quantification of the raw intensity values, the cyanine 5 and cyanine 3 average ratio fluorescence intensities for each BAC clone on each of the duplicate arrays (gpr files) were uploaded into the web-based SpectralWare® v2.3.3 software package (PerkinElmer Inc.), normalized with linear regression algorithms (on a log₂ scale) and plotted according to the BAC chromosomal location. The raw data from dye-reversed pairs were combined, and threshold values were ascertained to make inferences according to a clone-by-clone classification procedure to determine the gain, loss and no change status of each clone for each subject, relative to the diploid reference DNA. Data were normalized using the default "Pin Linear" parameter and the threshold values were determined by the software using the "Iterative 2.5X Sigmas" algorithm. Subsequent normalization of the data with "Block Lowess" method

was performed for verification of copy number changes. The quality criteria adopted included standard deviation of the intensity ratios among the duplicates less than 10% and more than 97.5 % of spots with adequate intensity ratio values for analysis [1]. Clone-by-clone changes were reviewed and only those aberrations detected in both hybridizations (four replicates) were studied further. Abnormal clones involving the Y and X chromosomes, as they were unlikely to be linked to the included fetuses phenotype, were discounted from further analysis.

All cytogenetic alterations detected on the arrays were matched against two known publicly online databases for copy number variations (Database of Genomics Variants and Copy Number Variation) and they were also tested in online scientific literature searching for a clinical correlation (Medline, OMIM, DECIPHER).

Results

Clinical and samples characterization

Forty nine unrelated fetuses were included in this study. For all families, both women and their husbands were healthy and no consanguineous. There was no family history of congenital malformations or genetic disorders, although three families related previous history of newborn death without definitive diagnosis. The mean maternal age was 26 years old (range 14-41), with a parity varying from zero to six. Eleven women had previous spontaneous abortions, eight out of them with just one abortion episode, two with 2 abortions and one woman with 4 previous abortions. None of the aborted products were investigated for cytogenetics aberrations. The mean gestational age at the moment of the fetal sampling was 29 weeks of gestation (range 21-39).

One analysis was noted not to be optimal according to quality control criteria and was further excluded. The mean DNA concentration in the fetal samples was 189 ng/μl (range from 46ng/μl to 515ng/μl), including the two samples after WGA.

In 32 fetuses the congenital defect presented as an isolated one and in the remaining 16 fetuses there were multiple congenital anomalies (MCA). The total fetal defects are listed in Table 1.

Table 1- Fetal anomalies observed in the study population of 48 fetuses

Fetal anomaly	N. cases
Congenital Diaphragmatic Hernia	12
Ventriculomegaly	7
Holoprosencephaly	4
Congenital heart defect	4
Nonimmune Hydrops	3
Dandy-Walker Malformation	1
Omphalocele	1
Multiple Congenital Anomalies	16
Total	48

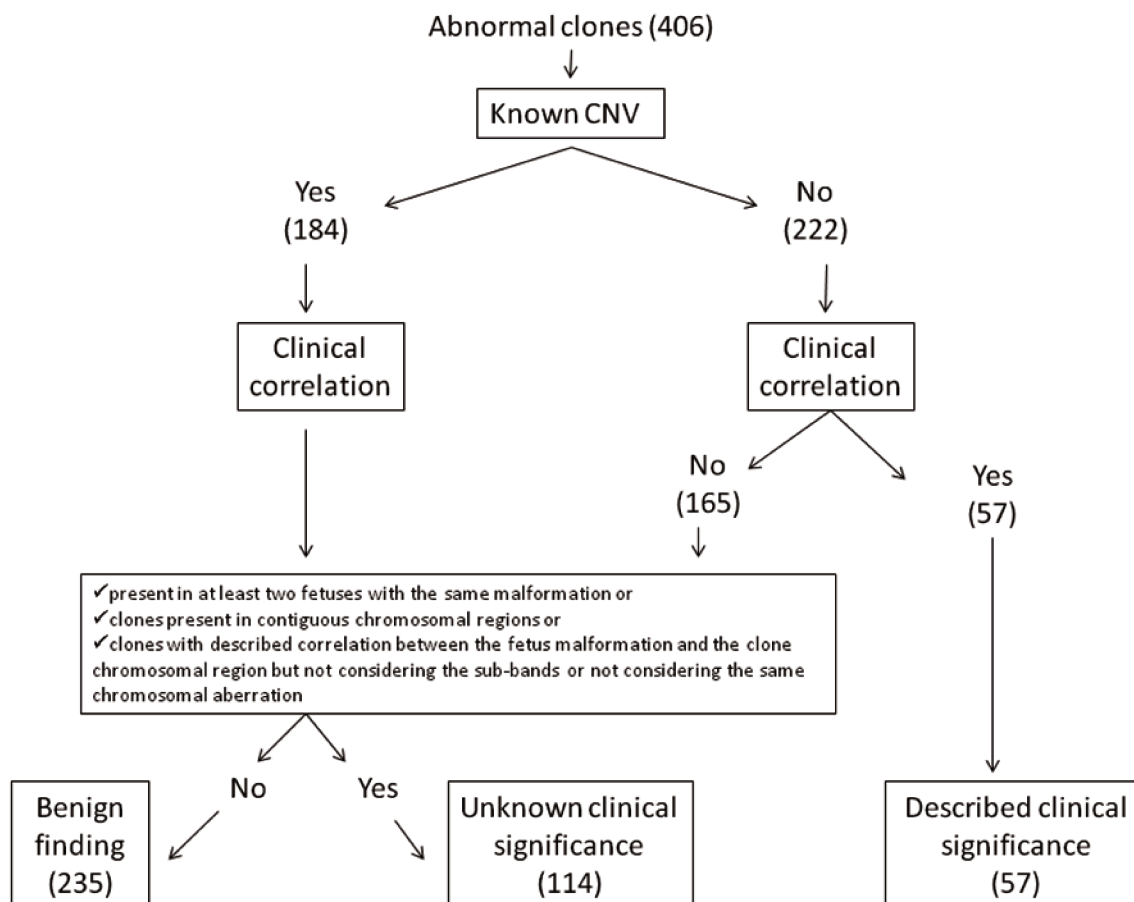
Clones and chromosomes analysis:

The array CGH analysis showed loss or gain of chromosomal material in 45 out of the 48 studied fetuses (93.7%). One fetus with congenital diaphragmatic hernia (CDH) showed a complete trisomy of chromosome 13, in spite of the normal result from referring laboratory on amniotic fluid at 24 weeks of gestation. A total of 406 copy number imbalances were present, excluding the 122 copy number gains in the trisomic fetus, with a mean of 8 abnormal clones for each fetus, ranging from zero (in the three completely normal cases) to 37 clones. Two hundred and three of the abnormalities were deletions and the same number of abnormalities was duplications.

One hundred and eighty four of the observed copy number imbalances (45.3%) were at described copy number variations (CNV) regions. For 57 clones (14%) we found at least one reported correlation between the fetus malformation and the same chromosomal region (considering bands and sub-bands), at non-described CNVs regions in the consulted literature. For the remaining 165 clones (40.7%) there was neither correlation with CNVs nor with reported genotype-phenotype in the revised literature.

The clones present in at least two fetuses with the same malformation, or clones present in contiguous chromosomal regions, or clones with described correlation between the fetus malformation and the clone chromosomal region but not considering the sub-bands or not considering the same chromosomal aberration in the consulted literature were eligible as “alterations with suspect significance”. There were a total of 114 clones (28% of the 406 abnormal clones) in the cited situations. The complete algorithm for clones’ classification results is outlined in Figure 1.

Figure 1- Algorithm for clones' classification array CGH results in 48 malformed fetuses



The chromosomes most commonly found to have copy number imbalances were the chromosome 4 (54 clones), 15 (53 clones) and 1 (37 clones), and the less affected was the chromosome 21 (2 clones, 1 clone in each of the 2 affected cases). The list of the number of abnormal clones found in each chromosome is shown in Table 2.

The chromosome region most commonly found to have aberration in copy number was 15q11.2, with 10 out of the 48 fetuses presenting deletion in this region, followed by the 15q22 and 15q25.2, with four fetuses presenting copy number deletions in each of these regions.

Table 2- Number of abnormal clones and affected cases in each chromosome in 47(*) malformed fetuses through array CGH

Chr	N of abnormal clones	N of affected cases
4	54	9
15	53	19
1	37	21
9	29	15
6	28	17
17	24	14
2	22	17
16	22	14
10	20	13
7	20	10
5	19	14
11	15	8
8	14	10
12	14	11
3	13	10
14	12	7
19	12	5
22	12	9
18	7	7
20	7	6
13	5	4
21	2	2

(*)Excluding the fetus with trisomy 13

Cases analysis:

We identified that in 16 fetuses (33.3% of the 48) there was correlation between the same chromosomal alteration in the same chromosomal regions and the congenital anomaly presented by the fetuses in at least one report in the consulted literature.

Also, we found that 13 out of the total of 48 fetuses (27%) showed 15 genomic imbalances that lead to cytogenetic result alteration with clinical impact, which could provide additional information for prenatal genetic counseling and risk assessment, including the fetus with complete trisomy of chromosome 13. Based on the physical mapping positions as obtained from the March 2006 Assembly of the UCSC Genome Browser, the size of the affected regions was determined and is shown in Table 3.

In 39 out of the 45 fetuses (86.7%) with copy number gain or loss, there was at least one CNV described in the affect clone representing region.

Table 3- Summary of the cases with abnormal array CGH significant results in 47(*) malformed fetuses with normal G-banded karyotype

Case	Fetal anomaly	Chromosomal abnormality	N.of abnormal clones in the region	Estimated size (Mb)
#12	Omphalocele	Del 15q11.2	3	2.48
		Del 9q34.3	2	3.12
#14	Holoprosencephaly	Dupl 11p15.5-pter	3	0.08
		Dupl 19q13.1-q13.2	2	1.34
#15	Holoprosencephaly	Del 5q12-q13	2	0.65
#26	MCA	Del 9p22-p24.3	7	13.63
#35	MCA	Del 4p15.1-p16.3	33	24.62
#38	CHD	Del 15q11.2	3	1.08
#41	NIH	Del 14q32.33	2	0.23
#42	NIH	Del 15q25.2	2	1.90
#43	MCA	Del 15q11.2	2	0.23
#46	MCA	Del 9p12	2	1.21
#48	MCA	Del 15q11.2-q13.1	14	4.36
		Del 9p13.1-q12	5	29.98
#50	MCA	Del 15q11.2	4	1.08

(*)Excluding the fetus with trisomy 13

Cases #12, #14 e #48 presented 2 chromosomal abnormalities.

MCA = Multiple Congenital Anomalies

CHD =Congenital Heart Defect

NIH = Nonimmune Hydrops

Mb = Megabases

Del = deletion; Dupl = duplication

Discussion

We reported the molecular findings of a selected group of 48 malformed fetuses with normal G-banded karyotype through a whole genome BAC array CGH approach and we identified abnormalities of copy number in 93.7% of these fetuses, excluding rearrangements at the Y and X chromosomes.

Retrospective and validation studies have demonstrated the usefulness of array CGH in prenatal diagnosis from different fetal samples and tissues [2-4], even in cell-free fetal DNA [5-7]. In recent years, prospective prenatal studies have been published [8-10] and proved to be an accurate diagnostic tool. The reported studies have used different methods for fetuses' selection, study design, array platforms and even results interpretation, making them few comparable.

For this study, we did not consider only the phenotype definition based on the requisition forms, that can not always reflect the true or complete fetus phenotype, but we confirmed the prenatally diagnosed malformations with postnatal or *post mortem* evaluation. In a recent prospective study, from the total of 84 samples submitted due to

ultra-sound abnormalities indication, in 20 cases (23.8%) the specific malformation was not specified on the records [10].

Also, we included only congenital malformations with a heterogeneous but strong genetic background, and fetuses with multiple congenital malformations. In both situations is expected a high prevalence of genetic abnormalities and it can explain our high detection rate of fetuses with copy number imbalances. In a preliminary study, we showed this fetuses' selection according to specific defect to be useful for prenatal diagnosis [11]. In the first prospective study in prenatal diagnosis, Sahoo et al. [8] reported a detection rate of chromosomal abnormalities of 43% of the 98 studied fetuses. Subsequent studies could not found the same rate. In an unselected group of 50 malformed fetuses with normal karyotype, Kleeman et al. [12] found 4 fetuses (8%) with abnormal array results. Studying a comparable number of cases, by including only fetuses with at least three anomalies and a target array of 287 clones, Le Caignec et al. [2] found array abnormalities in 16.3% of the 49 investigated fetuses. Using the same target array CGH to study retrospectively 37 malformed fetuses with at least two anomalies and normal karyotype, Vialard et al. [4] found abnormal results in 4 fetuses corresponding to 10.8%. Although the number of fetuses with copy number changes in our study was much higher than other reports, the number of fetuses with described CNVs among the detected genomic imbalances failed to show such a difference (Table 4).

Table 4- Number of fetuses with copy number abnormalities and copy number variation (CNV) in recent prenatal array CGH studies

Study	N of included fetuses	Fetuses with chromosomal imbalances	Fetuses with CNV
Machado et al. (*)	48	45 (94%)	39 (87%)
Le Caignec et al. (2005)	49	8 (16%)	NL
Sahoo et al. (2006)	98	42 (43%)	30 (71%)
Shaffer et al. (2008)	151**	15 (10%)	12 (80%)
Kleeman et al. (2009)	50	4 (8%)	3 (75%)
Vialard et al. (2009)	37***	4 (10%)	NL
Van den Veyver et al. (2009)	300	58 (19%)	40 (69%)

(*) Present study

** Considering only prenatal specimens

*** Considering only fetuses with normal karyotype

NL = not listed

The availability of the recent array CGH platforms for fetal chromosomal investigation, including the oligonucleotide arrays [13], has brought some controversy over the

ideal genetic testing for prenatal diagnosis [14-16]. The time and effort required for distinguishing the pathogenic and benign findings increases as the resolution of the array CGH increases, but uninterpretable results occur with all array CGH platforms [16]. Considering this, we selected the array CGH resolution used here according to our research objectives that did not include clinical decision for the pregnancies.

The imbalances were scattered over all chromosomes, but it appears not to be in a randomly distribution. There was a great difference between the chromosome 4 with 54 abnormal clones and the chromosome 21 with 2 abnormal clones. The chromosomes 4, 15 and 1 appeared with the greater number of abnormal clones, and the chromosome 1 was the most affected with 21 fetuses presenting some genomic imbalance, followed by the chromosome 15 with 19 affected fetuses. The chromosome 21 showed the smaller number of abnormal clones, followed by the chromosome 13 and 18. As they are the main chromosomes related to trisomy, our results suggest that the chromosome 21, 13 and 18 are most commonly involved in numeric aberration than in structural chromosomal aberrations in malformed fetuses.

The region exhibiting the highest number of anomalies in our series of fetuses was 15q11.2, the region known to be associated with Prader-Willi and Angelman syndromes. It was present in 10 out of 45 fetuses with copy number aberrations and it was the most affected chromosomal region involved in the cases we considered with clinical impact. Although the proximal 15q region is riddled with CNV content, it is composed by important conserved genes in vertebrates [17, 18], and a deletion of this region may be pathogenic [17]. The deleted 15q cases in our study lacked the main characteristic clinical features of the syndrome, highlighting the value of array CGH studies for prenatal diagnosis, in which the prenatal clinical manifestations may not be specific enough for focused FISH analysis.

Interesting, a fetus that appeared to be normal at the G-banding karyotype in amniotic fluid from a referring laboratory, showed a complete trisomy through the array CGH testing. This fetus had an isolated form of congenital diaphragmatic hernia, with no other abnormalities identified in prenatal ultra-sound and neonatal clinical evaluation. Although intensive neonatal care, the newborn male baby died within 30 days of life, previously to the array CGH result. The metaphase spread slide from the referring laboratory was not available in order to check for the discordant causal identification. However, the possibility of a low-level mosaicism can be pointed as probable causes, considering the complete

absence of associated dysmorphic features in the affected fetus and the limitation of the G-banding technique in detecting these mosaicisms.

As submicroscopic imbalances detected by array CGH in malformed fetuses are still beginning to be reported, we compared our abnormal results not only with other array CGH studies to investigate possible clinical correlation, but with any kind of cytogenetic evaluation. With the purpose of comparing our results with published reports on fetuses with the same malformations, we found that in 16 fetuses (33.3%) there were described the same chromosomal alteration in the same chromosomal regions. Additional research is needed to further establish the role of the related chromosome regions in congenital defect pathogenesis.

Very little is known about the natural history and range of clinical variability associated with recently described submicroscopic deletions and duplications detected by array CGH. It is worth noting that the presence of a deletion or duplication alone does not necessary mean that the copy number alteration causes the observed phenotype and we can not also assure to consider a copy number imbalance as to be pathogenic on the basis only of the association with fetal malformation indentified by ultrasound examination. However, the fetus presenting a significant structural anomaly has a high *a priori* risk of having a pathogenic genetic abnormality and, as is true for any test, the found copy number imbalance is more likely to be a true positive pathogenic one. In this group of malformed fetuses, we considered that at least 13 out of the 48 fetuses (27%) have some significant genomic imbalance according to the size and content of the abnormality, leading to cytogenetic result modification with clinical impact.

In this group of fetuses with significant genomic imbalances, excluding the fetus with trisomy of chromosome 13, the other twelve fetuses presented 13 deletions among the 15 identified genomic imbalances. This result is in concordance with the widely accept concept that deletions are more pathogenic than duplications [19].

Reviewing the 3 cases with aberrations greater than 10 Mb of size in the array analysis, we may conclude that the low quality of the obtained metaphase spreads could not show the chromosomal abnormalities. In one case (#26), the fetal karyotype result was indicated as normal, but with the advertisement of repeating the analysis after birth because a suspected structural abnormality involving chromosome 9. This abnormality was confirmed to be a 13.6 Mb deletion at the 9p22-p24 region by the CGH. Conversely, the

remaining 12 chromosomal aberrations identified through the array were smaller than 5 Mb, under the G-banded karyotype resolution, 10 out of them smaller than 3 Mb, even under the CGH to metaphase chromosomes resolution.

The indicated significant chromosomal regions are supported when considered that a copy number imbalance in such region was recurrent in fetuses with the same phenotype and when the same genotype-phenotype correlation has been already described. This way, we could identify some clones with uncertain but putative significance that provided a list of chromosomal regions of clinical interest for further molecular evaluation. Additional and confirmatory researches are needed to further establish the role of genes from this chromosome region in the pathogenesis of each specific congenital defect.

The inheritance background of our findings is unknown as we could not perform the parents' array CGH analysis. Even though, candidate chromosomal regions cannot be determined solely by using linkage analysis of familial cases. Other approach to determine which genes are involved consists in analyzing a large number of patients for common aberrations by use of high resolution genetic methodologies, such as array CGH. Here, we contributed for this evaluation. Novel molecular analysis of congenital malformation-critical chromosomal regions may ultimately define smaller regions and identify genes responsible for them. Subsequently, sequence analysis of genes mapped to this critical regions may reveal gene mutations and contribute to the identification of causative genes for congenital defects in human is a current goal as genetic treatment is a future challenger.

In our study, we were able to achieve optimal results using the array CGH protocol described here in quantities of fetal DNA as little as 43 ng/ μ l, overcoming the limitations of the many prenatal diagnostic assays, including the oligonucleotide array platforms. For only two samples we had to perform the whole genome amplification (WGA) before the array CGH analysis. The use of WGA products have been previously used for BAC array CGH and have produced results concordant with those using unamplified genomic DNA with no detectable amplification bias [8].

Microarray-based CGH is a powerful method to detect and analyze genomic imbalances that are well below the level of detection on banded karyotype. Other advantages of this molecular method is that it does not involve cell culture, does not require prior knowledge of the genomic region involved and the ability to study cases where only DNA is

available and no chromosomes can be obtained. The method was reproducible in a clinical standpoint, with reliable and fast results. Thus, we could also reinforce the establishment of the technique of array CGH as an excellent tool for prenatal diagnosis. But, it is important to emphasize that array CGH may not replace karyotype analysis, but it can complement and expand current methods for a precise prenatal diagnosis and syndromes' characterization.

In summary, using a whole genome BAC array CGH, we identified copy number imbalances in fetuses with isolated and multiple congenital anomalies that could not be detected by metaphase karyotype, especially in prenatal samples where the band resolution may be compromised. It should help to better understand the etiology of some congenital defects with prenatal manifestation. Additional research is needed to further establish the role of genes from related chromosome regions and to reach a consensus on the optimum platform of an array for clinical use in prenatal diagnosis.

Acknowledgments:

The authors have no conflict of interest with any of the information presented in this article. This work had been impossible without the aid of the families who agreed to participate. We specially thank members of the Cell Culture and Cytogenetics Laboratory of the Integral Assistance for Women's Health of the State University of Campinas (CAISM –Unicamp) for their contribution throughout the course of this project and Cássia Campanhol for having done all the routine karyotyping. We thank Christopher Williams and Audrey Yumi Otsuka (PerkinElmer Inc.) for their specialized technical assistance. This study was sponsored in part by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant No. 2007/04684-0) and in part by Fetal Medicine Foundation (FMF).

Electronic-Database and online software:

The URL for data presented herein is as follows:

- SpectralWare® v2.3.3 software (PerkinElmer Inc.), <http://service.spectralgenomics.com> (for the array analysis).
- Database of Genomics Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/> (for CNV search)
- Copy Number Variation, <http://cnv.chop.edu/> (for CNV search).
- UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/> (for physical mapping positions and size determination of chromosomal regions).
- Medline, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (*for literature search*).

- *OMIM* - Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> (for literature search).
- *DECIPHER* - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, <http://decipher.sanger.ac.uk> (for literature search).

References:

- 1 Vermeesch J, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, De Moor B, Van Hummelen P, Marynen P, Fryns J, Devriendt K: Molecular karyotyping: Array cgh quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005;53:413-422.
- 2 Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival J: Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005;42:121-128.
- 3 Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng B, Scott C, Whittaker J, Adinolfi M, Carter N, Bobrow M: Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array cgh. *J Med Genet* 2006;43:353-361.
- 4 Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, Quarello E, Escalona A, Le Sciellour C, Serazin V, Roume J, Ville Y, de Mazancourt P, Selva J: Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: Another experience. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:277-284.
- 5 Larrabee P, Johnson K, Pestova E, Lucas M, Wilber K, LeShane E, Tantravahi U, Cowan J, Bianchi D: Microarray analysis of cell-free fetal dna in amniotic fluid: A prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet* 2004;75:485-491.
- 6 Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K, Sosonkina N, Harada N, Shimokawa O, Nakayama D, Yoshimura S, Matsumoto N, Niikawa N, Ishimaru T: Microarray comparative genomic hybridization (cgh)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal dna in amniotic fluid. *J Hum Genet* 2006;51:412-417.
- 7 Lapaire O, Lu X, Johnson K, Jarrah Z, Stroh H, Cowan J, Tantravahi U, Bianchi D: Array-cgh analysis of cell-free fetal dna in 10 ml of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn* 2007;27:616-621.

- 8 Sahoo T, Cheung S, Ward P, Darilek S, Patel A, del Gaudio D, Kang S, Lalani S, Li J, McAdoo S, Burke A, Shaw C, Stankiewicz P, Chinault A, Van den Veyver I, Roa B, Beaudet A, Eng C: Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 2006;8:719-727.
- 9 Shaffer L, Coppinger J, Alliman S, Torchia B, Theisen A, Ballif B, Bejjani B: Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* 2008;28:789-795.
- 10 Van den Veyver I, Patel A, Shaw C, Pursley A, Kang S, Simovich M, Ward P, Darilek S, Johnson A, Neill S, Bi W, White L, Eng C, Lupski J, Cheung S, Beaudet A: Clinical use of array comparative genomic hybridization (acgh) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 2009;29:29-39.
- 11 Heinrich J, Machado I, Vivas L, Bianchi M, Cursino Andrade K, Sbragia L, Barini R: Prenatal genomic profiling of abdominal wall defects through comparative genomic hybridization: Perspectives for a new diagnostic tool. *Fetal Diagn Ther* 2007;22:361-364.
- 12 Kleeman L, Bianchi D, Shaffer L, Rorem E, Cowan J, Craigo S, Tighiouart H, Wilkins-Haug L: Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* 2009;29:1213-1217.
- 13 Bi W, Breman A, Venable S, Eng P, Sahoo T, Lu X, Patel A, Beaudet A, Cheung S, White L: Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array cgh. *Prenat Diagn* 2008;28:943-949.
- 14 Pergament E: Controversies and challenges of array comparative genomic hybridization in prenatal genetic diagnosis. *Genet Med* 2007;9:596-599.
- 15 Ogilvie C, Yaron Y, Beaudet A: Current controversies in prenatal diagnosis 3: For prenatal diagnosis, should we offer less or more than metaphase karyotyping? *Prenat Diagn* 2009;29:11-14.
- 16 Friedman J: High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2009;29:20-28.

- 17 Chai J, Locke D, Greally J, Knoll J, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler E, Nicholls R: Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots bp1 and bp2 of the prader-willi/angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* 2003;73:898-925.
- 18 Sahoo T, Peters S, Madduri N, Glaze D, German J, Bird L, Barbieri-Welge R, Bichell T, Beaudet A, Bacino C: Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with angelman syndrome: Genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 2006;43:512-516.
- 19 Jackson L: Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:622-639; discussion 730-622.

4.3. Artigo 3

ASSOCIAÇÃO ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA DR OSWALDO LANGE

Praça Amadeu Amaral 47 conj 33 01327-010 São Paulo SP - Brasil

Fone (11) 3287.6600 - FAX (11) 3289.8879

e-mail: anprev@terra.com.br

DECLARAÇÃO

Declaro que o manuscrito "GENOMIC IMBALANCES DETECTED THROUGH ARRAY CGH IN FETUSES WITH HOLOPROSENCEPHALY" dos autores *Isabela Nelly Machado, Juliana Karina Heinrich, Ricardo Barini* foi submetido à revista Arquivos de Neuro-Psiquiatria, recebeu o número ANP-641/2009 e está em fase de avaliação por pares.

São Paulo, 18 de janeiro de 2009.

Luís dos Ramos Machado

Title: Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly.

Authors: Isabela Nelly Machado, Juliana Karina Heinrich, Ricardo Barini.

Institution: Cell Culture and Cytogenetics Laboratory, Fetal Medicine Program of the Integral Assistance for Women's Health (CAISM) of the Department of Obstetrics and Gynecology. Faculty of Medical Sciences. State University of Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brazil.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest with any of the information presented in this article.

This study was sponsored by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant No. 2007/04684-0).

Corresponding author:

Isabela Nelly Machado

Department of Obstetrics and Gynecology.

Rua Alexander Fleming, 101. Cidade Universitária. UNICAMP

Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Tel/Fax: 55 19 3521 9304

Email: imachado@fcm.unicamp.br

Abstract:

Objective: Holoprosencephaly (HPE) is heterogeneous in pathogenesis, integrating genetic susceptibility with the influence of environmental factors. Submicroscopic aberrations may contribute to the etiology of HPE. Our aim was to report the molecular analysis of 4 fetuses with HPE and normal metaphase karyotype. **Methods:** A whole genome BAC-array based Comparative Genomic Hybridization (array CGH) was carried out in fetal blood samples. All potential cytogenetic alterations detected on the arrays were matched against the known CNV databases. **Results:** The array CGH analysis showed copy number gains and losses in all cases. We found a recurrent deletion in 15q14 (clone RP11-23J11) and in 15q22 (clone RP11-537k8) in 2 out of 4 cases analyzed. We also observed submicroscopic gain in 6p21 in 3 out of 4 fetuses in nearby clones. All these regions were tested in known databases and no copy number variations (CNV) have been described for them. **Conclusion:** This is the first report of molecular characterization through a whole genome microarray CGH of fetuses with HPE. Our results may contribute to verify the effectiveness and applicability of the molecular technique of array CGH for prenatal diagnosis purposes, and contributing to the knowledge of the submicroscopic genomic instability characterization of HPE fetuses.

Keywords: holoprosencephaly; array comparative genomic hybridization; prenatal diagnosis; genetic causes; molecular biology.

Introduction:

Holoprosencephaly (HPE, OMIM 2361000) is the most common developmental defect of midline cleavage in human embryonic forebrain, with a variable phenotypic expression. Its estimated prevalence is of 1:16,000 live-births [1] and 1:250 conceptuses [2], but it should be higher considering the current advances in neuroimaging that allow the diagnosis of less severe forms of this malformation. The association of holoprosencephaly with other fetal structural and chromosomal abnormalities justifies a detailed investigation of the fetal morphology and karyotype.

Our current understanding of the pathogenesis of HPE attempts to integrate genetic susceptibility with the epigenetic influence of environmental factors. Identifiable genetic causes in humans account for about 15-20% of all cases [3]. The most common chromosomal abnormality associated to holoprosencephaly is the trisomy 13. To date,

known human mutations at least 12 different genetic loci have been associated with HPE [4], but a very small percentage of all cases has a molecularly defined HPE. Therefore, submicroscopic aberrations may contribute to the etiology of HPE.

The aim of this study was to report the molecular findings through a whole genome array comparative genomic hybridization (array CGH) of 4 fetuses with prenatal ultra-sound diagnosis of HPE in an attempt to improve the knowledge of the submicroscopic abnormalities presented in these malformed fetuses.

Methods:

Patients and samples:

For this study, fetuses with holoprosencephaly as an isolated brain malformation, no recognized genetic syndrome, and normal metaphase karyotype delivered between January 2008 and July 2009 were prospectively included. This study was carried out after the protocol approval by the institution's ethical committee.

The fetal and parental karyotype analysis was performed using G-banded metaphase chromosomes at approximately the 500 band level. All the parents gave informed consent. The presence and morphologic classification of HPE was confirmed by postnatal MRI (magnetic resonance imaging) or autopsy reports. Maternal diabetes mellitus, drug ingestion, exposure to alcohol and infections were excluded.

Fetal blood samples were collected by cordocentesis at different week's gestation for karyotype, according to the guidelines of the Fetal Medicine Unit of the Women's Hospital of the State University of Campinas (Unicamp).

Molecular study:

Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol for whole blood.

Array Comparative Genomic Hybridization was carried out using the Constitutional Chip® 4.0 (PerkinElmer Inc., Turku, Finland), comprised of approximately 5000 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clones, covering the whole human genome with an average resolution of < 650 kb and spotted in duplicate.

For each experiment, a sex-mismatched normal reference DNA (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. The DNA concentrations used were 40ng/μl. All experiments included dye reversal and two array hybridizations to obtain an accurate ratio. After post-hybridization washes, slides were scanned, and captured images were analyzed by either the GenePix® Pro 6.0 (Molecular Devices Corp.) or the ScanArray Express® (Microarray Analysis System 4.0.0.4) software.

After quantification, the cyanine 5 and cyanine 3 average ratio fluorescence intensities for each BAC clone on each of the duplicate arrays (gpr files) were uploaded into the web-based SpectralWare® v2.3.3 software (PerkinElmer Inc.), normalized with linear regression algorithms (on a log₂ scale) and plotted according to the BAC chromosomal location. The raw data from dye-reversed pairs were combined, and threshold values were ascertained to make inferences according to a clone-by-clone classification procedure to determine the gain, loss and no change status of each clone for each subject, relative to the diploid reference DNA. The threshold values were determined by the software using the “Iterative 2.5X Sigmas” algorithm. Subsequent normalization of the data with “Block Lowess” method was performed for verification of copy number changes. The *P* values for each probe were also calculated, furnishing additional objective statistical criteria to determine whether deviation of each probe from zero is a significant change [5]. The quality criteria adopted included standard deviation of the intensity ratios among the duplicates less than 10% and more than 97.5% of spots with adequate intensity ratio values for analysis [6]. For each analysis, all quality control metrics were noted to be optimal. Clone-by-clone changes were reviewed and only those aberrations detected in both hybridizations were studied further.

All potential cytogenetic alterations detected on the arrays were matched against the known online databases to determine whether they encompassed described copy number variations (CNV) regions.

Results:

Four unrelated fetuses were included in this study. There was no family history of congenital malformations or genetic disorders. Both women and their husbands were healthy, no consanguineous and presented normal chromosomes at G-band analysis of peripheral blood. The morphological classification of HPE, maternal age, gestational age of the fetal sampling,

fetal karyotype result and the number of genomic imbalances observed in each case is shown in Table 1. The array CGH analysis showed copy number gains and losses in all cases.

We identified recurrent deletion in 15q14 and in 15q22 in 2 out of 4 cases analyzed. Based on the physical mapping positions as obtained from the March 2006 and February 2009 Assembly of the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), the size of the deleted regions were determined to be 40,492 bp (37,806,124-37,846,615) and 174,345 bp (62,082,000-62,256,344), respectively. We also observed a recurrent copy number gain in 6p21 region in 3 out of 4 evaluated fetuses involving different but close clones (Figure 1). The complete list of abnormal clones found in the four fetuses is listed in Table 2. Details about the recurrent abnormal clones are listed in Table 3.

All the identified common regions were tested in known databases and four copy number variations (CNV) were found and excluded. They were gain at 1p36, 2q37.3 and 9q34, and loss at 5q13.

Table 1 – Maternal age, HPE classification, gestational age of cordocentesis, karyotype results and total number of abnormal clones found in 4 fetuses with holoprosencephaly.

Case #	Maternal age (years)	HPE classification	GA of cordocentesis	Karyotype	Total number of abnormal clones
#1	36	Lobar	33	46,XX	20
#2	14	Lobar	31	46,XY	17
#3	28	Semi lobar	31	46,XY	22
#4	28	Alobar	27	46,XY	5

GA= gestational age (weeks).

Table 2 – Abnormal clones detected in 4 fetuses with holoprosencephaly using whole genome array CGH.

#1		#2		#3		#4	
G	L	G	L	G	L	G	L
RP1-283E3	RP11-328L16	RP4-628J24	RP11-23J11	RP11-625N16	RP11-91G12	RP11-353K11	
RP1-160H23	RP3-375M21	RP1-77N19	RP11-537K8	RP11-118M12	RP11-352A18	RP5-1011O17	
RP11-602P21	RP11-173D3	RP5-856G1	RP11-300G13	RP3-462C17	RP11-551B22	RP11-15M20	
RP11-48C7		RP1-86C11		RP11-483F11	RP11-3G21	RP1-103M22	
RP1-44H16		RP3-428L16		GS-261-B16	RP11-107O19	RP11-80F22	
GS-908-H22		RP3-366N23		RP11-416K5	RP11-23J11		
RP5-908H22		RP11-173G21		RP11-160E2	RP11-537K8		
RP11-598F7		RP11-738I14		RP11-46E14			
RP11-277E18		RP11-91H5		GS-325-I23			
RP11-256C2		RP11-79M19		RP5-860F19			
RP11-26M6		RP11-142I8		RP11-379J5			
CTD-2184G2		RP11-103B5		RP4-745C22			
RP11-64L12		RP11-173D3		RP1-141I3			
RP11-67A5		RP1-81F12					
RP11-384E6							
RP11-17I20							
RP1-104C13							

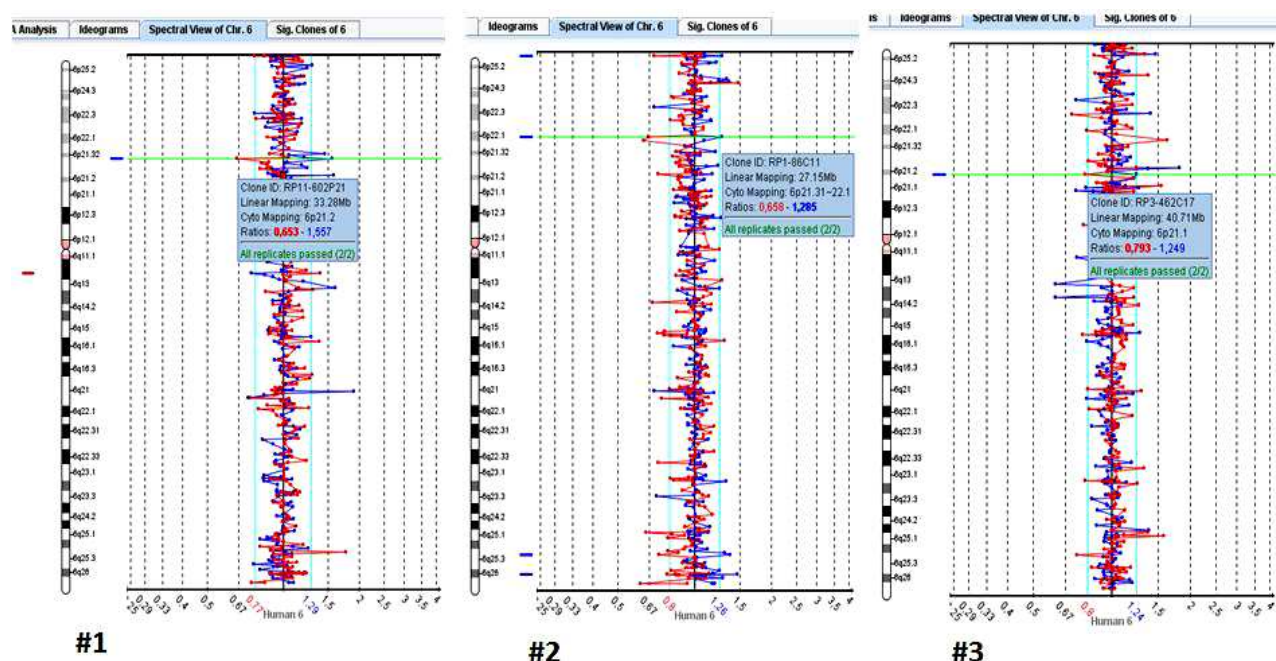
L= Loss; G= Gain

Table 3 - Recurrent abnormal clones in 4 fetuses with holoprosencephaly.

Clone	Chromosome region	Size (bp)	Affected cases
RP11-23J11	15q14	40,492	#2, #3
RP11-537k8	15q22	174,345	#2, #3
RP3-462C17	6p21.1	118,106	#3
RP11-602P21	6p21.2	224,030	#1
RP1-86C11	6p21.3	89,016	#2

bp= base pairs.

Figure 1- Spectral view of chromosome 6 showing recurrent gain at 6p21.



Discussion:

HPE seems to be a multiple hit pathology, requiring two or more events involving several genes and/or environmental factors [7]. The pathology of HPE can be caused by environmental (drugs, infections) and metabolic (diabetes mellitus, alcohol, smoking) factors. Among genetic causes, it can be part of defined malformations syndromes with normal karyotype, chromosomal abnormalities as trisomy 13, trisomy 18 and triploidy, or it can be due to known sequence mutations on described chromosome regions.

The currently identified HPE genes only account for a small portion of all sporadic HPE cases (15-20%) [3], and mutations in the currently recognized HPE genes explain only a very small proportion of all sporadic HPE cases [8]. In a cohort of 424 unrelated postnatal

cases with severe central nervous system findings, normal karyotype and negative for the four main HPE genes, micro deletions were found in 4.7% and no micro deletions were found in 85 individuals with HPE microsigns [9]. The same group of researchers found a percentage of 8.5% of microdeletions in the prenatal period in 97 fetuses [10]. The remaining cases are assumed to be a non-known etiology manifestation: neither environmental, nor syndromic, nor chromosomal [4]. The difficulties in identifying these genes may relate to the multigenic nature of HPE. Loss of function in a single HPE gene may not lead to the disease. In human, there will be other modifier genes acting in addition [11].

Therefore, we hypothesized that there are still unidentified genes causing underlying submicroscopic aberrations that could contribute to the etiology of HPE. In a first attempt to identify novel candidate regions involved in the pathology of this heterogeneous disease, and to evaluate the feasibility of BAC arrays in the analysis of prenatal samples, we used an array CGH pangenomic approach to report the molecular characterization of group of 4 fetuses with normal karyotype and diagnosis of HPE visible by ultra-sound prenatal care.

The array CGH analysis showed copy number gains and losses in all cases. Interestingly, the alobar case, the more severely affected fetus, presented the smallest number of genomic abnormalities. Indeed, our results did not allow an inkling of correlation between the number and size of these imbalances and the severity of the phenotype.

The current described genes and candidate genes for HPE, with its respective chromosome regions are presented in Table 4 [4]. It was not a goal of this study to search for mutations in the four main HPE genes (SHH, ZIC2, SIX3, TGIF), but we could observe that there were no abnormal clones in their known loci.

A Medline search using the keywords 15q14 and holoprosencephaly could not find any citation. The same occurred using the association of 15q22 and holoprosencephaly. One patient was related with a de novo reciprocal translocation affecting the breakpoints 6p21.1 and 7q36, presenting premaxillary agenesis (part of the HPE spectrum) as well as skeletal abnormalities and impacted teeth reminiscent of cleidocranial dysplasia (CCD). But, in this patient, the HPE phenotype could be explained by the 7q36 breakpoint that maps to the sonic hedgehog gene (SHH), the HPE3 described locus. As the mutations in genes mapping the 6p21 region can cause CCD, the breakpoint in this region in this case appears to explain the CCD phenotype [12].

Table 4 - Known genes and candidate genes for HPE.

LOCI and known HPE genes		Candidate genes	
236100	HPE1 21q22.3	Investigated or under investigation	
157170	HPE2 2p21 SIX3	600909	LSS 21q22,3 HPE1
142945	HPE3 7q36 SHH	605194	CFC1 2q21.1
142946	HPE4 18p11.3 TGIF	181590	SIL 1p32
609637	HPE5 13q32 ZIC2	605189	DKK1 10q11.2
605934	HPE6 2q37.1-q37.3	Hypothetical	
601309	HPE7 9q22.3 PTCH	602103	TMEM1 21q22.3
609408	HPE8 14q prox	600288	FOXA2 20p11
–	HPE9 20p13	607502	DISP1 1q42
–	HPE10 1q42-qter	609486	EAPP 14q13 HPE8
–	HPE11 5pter	609863	TECT1 12q24.1
–	HPE12 6q26-qter	603475	CHRD 3q27
600725	gene SHH 7q36	602991	NOG 17q22
602630	gene TGIF 18p11.3	600073	LPR2 2q24-q31
603073	gene ZIC2 13q32	601500	SMO 7q32.2
603714	gene SIX3 2p21	606178	HHIP 4q31.22
187395	gene TDGF1 3p23-p21	112262	BMP4 14q22.2
601309	gene PTCH 9q22	601265	NODAL 10q22.1
603621	gene FOXH1 8q24.3	601366	SMAD2/4 18q21
165230	gene GLI2 2q14	608707	CDO 11q23-q24
		605049	TWSG1 18p11.3

Dubourg et al., 2007.

A possible association between the 15q22 region and holoprosencephaly could be postulated considering that, in some instances, the agenesis of corpus callosum can be part of the holoprosencephaly spectrum [3]. Of the clinical manifestations reported cases of individuals with deletions encompassing 15q15-q22 region, one patient showed partial agenesis of corpus callosum [13] and other showed hypoplastic corpus callosum [14].

The inheritance background of our findings is unknown as blood samples from the parents were not available for array CGH analysis to determine if the copy number gains were inherited or de novo.

The greatest care must be taken for molecular prenatal diagnosis in HPE. Even if a mutation has been identified and seems to be transmitted with clinical manifestations in the family, another event, like a mutation in another gene (not yet identified) or an environmental factor, may be necessary to generate the holoprosencephaly phenotype [7]. In this case, molecular biology performed prenatally provides only an additional criterion with regard to prenatal ultrasound or MRI, which still takes precedence over molecular analysis.

Microarray-based CGH is a powerful method to detect and analyze genomic imbalances that are well below the level of detection on high resolution banded karyotype

analysis providing a better opportunity for genotype/phenotype correlations in other similarly affected individuals. Array CGH is relatively widely used in genetic testing of children, but true potential is still under-explored in prenatal diagnosis.

Some advantages of this molecular method is that it does not involve cell culture, does not require prior knowledge of the genomic region involved and the ability to study cases where only DNA is available and no chromosomes can be obtained. The method was reproducible in a clinical standpoint, with reliable results within 48 hours. Thus, we demonstrate that the technique of array CGH can become an excellent tool for prenatal diagnosis. But, it is important to emphasize that array CGH may not replace conventional G-banded karyotype analysis, but it can complement and expand current methods for a precise prenatal diagnosis and syndromes' characterization. One advantage of G banding analysis is that it allows the detection of somatic chromosomal mosaicism, which has been described in some patients with PHE.

Based on our results, array CGH results are promising in prenatal genetic testing and a study for submicroscopic deletions in fetuses with non-syndromic HPE should be considered as part of the routine laboratory evaluation, in addition to high resolution chromosomal and mutation analysis. Positive results in any of these studies will help to better understand the etiology of HPE and aid the establishment of the recurrence risk for family counseling. Moreover, additional research is needed to further establish the role of genes from related chromosome regions in brain development and to determine the prevalence of copy number gain in the 15q and 6p regions among HPE patients. Also, in accordance with others authors, epidemiologic investigations should be conducted to check off environmental factors that could act in coordination with genetic events to give rise to holoprosencephaly.

Acknowledgments:

The authors have no conflict of interest with any of the information presented in this article. We are grateful to the families who participate in this research. We thank members of the Cell Culture and Cytogenetics Laboratory of the Women's Hospital (CAISM – State University of Campinas – UNICAMP) for their contribution throughout the course of this project and Christopher Williams (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) for skilled

technical assistance. This study was sponsored by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant No. 2007/04684-0).

Electronic-Database and online software:

The URL for data presented herein is as follows:

SpectralWare® v2.3.3 software (PerkinElmer Inc.), <http://service.spectralgenomics.com> (for the array analysis).

Database of Genomics Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/> (for CNV search)

Copy Number Variation, <http://cnv.chop.edu/> (for CNV search).

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>. (for physical mapping positions and size determination of chromosomal regions).

Medline, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. (*for literature search*).

References:

1. Rasmussen S, Moore C, Khoury M, Cordero J. Descriptive epidemiology of holoprosencephaly and arhinencephaly in metropolitan Atlanta, 1968-1992. *Am J Med Genet* 1996, 66(3):320-333.
2. Matsunaga E, Shiota K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology* 1977, 16(3):261-272.
3. Cohen MJ. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006, 76(9):658-673.
4. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis* 2007, 2:8.
5. Ng G, Huang J, Roberts I, Coleman N. Defining ploidy-specific thresholds in array comparative genomic hybridization to improve the sensitivity of detection of single copy alterations in cell lines. *J Mol Diagn* 2006, 8(4):449-458.
6. Vermeesch J, Melotte C, Froyen G, *et al.* Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005, 53(3):413-422.
7. Ming J, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 2002, 71(5):1017-1032.
8. Nanni L, Croen L, Lammer E, Muenke M. Holoprosencephaly: molecular study of a California population. *Am J Med Genet* 2000, 90(4):315-319.

9. Bendavid C, Haddad B, Griffin A, *et al.* Multicolour FISH and quantitative PCR can detect submicroscopic deletions in holoprosencephaly patients with a normal karyotype. *J Med Genet* 2006, 43(6):496-500.
10. Bendavid C, Dubourg C, Gicquel I, *et al.* Molecular evaluation of fetuses with holoprosencephaly shows high incidence of microdeletions in the HPE genes. *Hum Genet* 2006, 119(1-2):1-8.
11. Shen J, Walsh C. Targeted disruption of Tgif, the mouse ortholog of a human holoprosencephaly gene, does not result in holoprosencephaly in mice. *Mol Cell Biol* 2005, 25(9):3639-3647.
12. Fernandez B, Siegel-Bartelt J, Herbrick J, Teshima I, Scherer S. Holoprosencephaly and cleidocranial dysplasia in a patient due to two position-effect mutations: case report and review of the literature. *Clin Genet* 2005, 68(4):349-359.
13. Lalani S, Sahoo T, Sanders M, Peters S, Bejjani B. Coarctation of the aorta and mild to moderate developmental delay in a child with a de novo deletion of chromosome 15(q21.1q22.2). *BMC Med Genet* 2006, 7:8.
14. Koivisto P, Koivisto H, Haapala K, Simola K. A de novo deletion of chromosome 15(q15.2q21.2) in a dysmorphic, mentally retarded child with congenital scalp defect. *Clin Dysmorphol* 1999, 8(2):139-141.

4.4. Artigo 4

Isabela Nelly Machado

De: onbehalfof+LKeys+tuftsmedicalcenter.org@manuscriptcentral.com em nome de LKeys@tuftsmedicalcenter.org
Enviado em: quarta-feira, 25 de novembro de 2009 15:45
Para: imachado@fcm.unicamp.br
Assunto: Prenatal Diagnosis - Manuscript Received - PD-09-0482
Anexos: _AVG certification_.txt

Dear Dr Machado

Your manuscript 'Prenatal diagnosis of copy number imbalances in fetuses with congenital diaphragmatic hernia' has been received by Prenatal Diagnosis.

Your manuscript number is PD-09-0482. Please make a note of this and use it in any future correspondence regarding this article.

This journal has a completely digital workflow. If you have any difficulty with our system, please contact me.

Thank you for your submission.

Yours sincerely

Linda Keys
Editorial Assistant
Prenatal Diagnosis
lkeys@tuftsmedicalcenter.org

Prenatal Diagnosis online:
<http://www.interscience.wiley.com/prenataldiagnosis>

Prenatal Diagnosis online submission, tracking and peer review:
<http://mc.manuscriptcentral.com/pd>

Title: Prenatal diagnosis of copy number imbalances in fetuses with congenital diaphragmatic hernia.

Running head: Copy number imbalances in CDH fetuses

Authors: Isabela Nelly Machado, Juliana Karina Heinrich, Ricardo Barini, Cleisson Fábio Andrioli Peralta

Institution: Cell Culture and Cytogenetics Laboratory, Fetal Medicine Program of the Department of Obstetrics and Gynecology. Faculty of Medical Sciences. State University of Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author:

Isabela Nelly Machado

Rua Alexander Fleming, 101. Cidade Universitária. UNICAMP

13083-970, Campinas, SP, Brazil

Email: imachado@fcm.unicamp.br

Abstract:

Objective: Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a phenotypically and genetically heterogeneous disorder, resulting from a complex inheritance pattern, with increasing evidence of genetic cause. Structural abnormalities of almost all chromosomes have been described in association with CDH. The aim of our study was to describe the molecular analysis through array comparative genomic hybridization (array CGH) of a group of thirteen fetuses with prenatal ultra-sound diagnosis of CDH and normal G-banded karyotype.

Methods: A whole genome BAC-array based Comparative Genomic Hybridization (array CGH) was carried out in fetal blood samples. All potential cytogenetic alterations detected on the arrays were matched against the known CNV databases.

Results: The array CGH analysis showed copy number gains and losses in 10 out of 13 cases. We compared the identified clones with the previously described in the literature. One fetus showed a complete trisomy of chromosome 13. We identified a recurrent deletion in 15q22 and a recurrent gain in 17q12 in 2 out 13 cases analyzed. **Conclusion:** Our results may contribute to verify the effectiveness and applicability of the molecular technique of array CGH for prenatal diagnosis purposes, and also to elucidate the submicroscopic genomic instability of CDH fetuses.

Keywords: congenital diaphragmatic hernia, array comparative genomic hybridization, prenatal diagnosis, genetic pathways, molecular biology.

Introduction:

Congenital diaphragmatic hernia (CDH, OMIM 142340) is a phenotypically and genetically heterogeneous disorder. It can occur as an isolated anomaly, associated with multiple defects or as part of a defined syndrome. Although the exact etiology of most cases of CDH remains unknown, there is increasing evidence that genetic factors play an important role in the development of CDH. Different chromosomal abnormalities are associated with CDH (Pober et al. 2005) and in about 10% of the prenatally detected cases a chromosomal anomaly is identified, most often aneuploidy (Witters et al. 2001). With the advent of novel molecular cytogenetic techniques, an increasing number of structural submicroscopic chromosomal anomalies are detected.

The aim of this study was to describe the molecular analysis through a whole genome array comparative genomic hybridization (array CGH) of a group of fetuses with prenatal ultra-sound diagnosis of CDH, in an attempt to improve the knowledge of the submicroscopic abnormalities presented in these malformed fetuses.

Methods:**Patients and samples:**

This study was carried out prospectively during a 19-month period (from January 2008 to July 2009), after the protocol approval by the institution's ethical committee. The inclusion criteria consisted of fetuses with an ultra-sound diagnosis of CDH and normal G-banding karyotype. The fetal and parental karyotype analysis was performed using G-banded metaphase chromosomes at approximately the 500-band level, and all parents gave informed consent.

Fetal samples were collected by cordocentesis at different week's gestation for karyotype, according to the guidelines of the Fetal Medicine Program of the Center for Integral Assistance for Women's Health of the State University of Campinas (Unicamp). Clinical data were obtained through the medical records. Besides the sample demographic characterization, it included the complete described findings in the prenatal ultrasound records, the babies' features observed through clinical examination by neonatologists and geneticists after birth, the cytogenetic results and autopsy findings.

Molecular study:

Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol for whole blood.

Array Comparative Genomic Hybridization was carried out using the Constitutional Chip® 4.0 (PerkinElmer Inc., Turku, Finland), comprised of approximately 5000 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) clones, covering the whole human genome with an average resolution of < 650 kb and spotted in duplicate.

For each experiment, a sex-mismatched normal reference DNA (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. The DNA concentrations used were 40ng/μl. All experiments included dye reversal and two array hybridizations to obtain an accurate ratio. The labeling and hybridization steps involved reagents supplied by the array manufacturer (PerkinElmer Inc., Turku, Finland). The labeled DNA was hybridized to Constitutional Chip® 4.0 at 37°C for 16-18 hours. After post-hybridization washes, slides were scanned, and captured images were analyzed by either the GenePix® Pro 6.0 (Molecular Devices Corp.) or the ScanArray Express® (Microarray Analysis System 4.0.0.4) software.

After quantification, the cyanine 5 and cyanine 3 average ratio fluorescence intensities for each BAC clone on each of the duplicate arrays (gpr files) were uploaded into the web-based SpectralWare® v2.3.3 software (PerkinElmer Inc.), normalized with linear regression algorithms (on a log₂ scale) and plotted according to the BAC chromosomal location. The raw data from dye-reversed pairs were combined, and threshold values were ascertained to make inferences according to a clone-by-clone classification procedure to determine the gain, loss and no change status of each clone for each subject, relative to the diploid reference DNA. The threshold values were determined by the software using the “Iterative 2.5X Sigmas” algorithm. Subsequent normalization of the data with “Block Lowess” method was performed for verification of copy number changes. The P values for each probe were also calculated, furnishing additional objective statistical criteria to determine whether deviation of each probe from zero is a significant change (Ng et al. 2006). The quality criteria adopted included standard deviation of the intensity ratios among the duplicates less than 10% and more than 97.5 % of spots with adequate intensity ratio values for analysis (Vermeesch et al. 2005). For each analysis, all quality control metrics were noted to

be optimal. Clone-by-clone changes were reviewed and only those aberrations detected in both hybridizations were studied further.

All potential cytogenetic alterations detected on the arrays were matched against the known online databases to determine whether they encompassed described copy number variations (CNV) regions.

Results:

Thirteen unrelated fetuses were included in this study, twelve as an isolated malformation and one associated with omphalocele, cardiac anomaly and intra-uterine growth restriction. For all families, both women and their husbands were healthy, no consanguineous and presented normal chromosomes at G-band analysis of peripheral blood. There was no family history of congenital malformations or genetic disorders. The side of the diaphragm defect, maternal age, fetal material source, fetal karyotype result, the number of genomic imbalances and total number of copy number variations (CNV) observed in each case is shown in Table 1.

The array CGH analysis showed copy number gains and losses in 11 out of the 13 cases. One fetus showed a complete trisomy of chromosome 13, regardless of the normal result at amniotic fluid at 24 weeks of gestation. All abnormal clones are listed in Table 2. A total of 100 clones presented with genomic imbalances, excluding the 122 duplicated ones at chromosome 13 in the trisomic fetus. A total of 36 clones presented described copy number variations (CNV) encompassing their *loci*.

We identified a recurrent deletion at 15q22 (clone RP11-537K8 in cases #3 and #12) and a recurrent gain at 17q12 (clone RP11-744L17 in cases #4 and #11) in 2 out 13 cases analyzed. Based on the physical mapping positions as obtained from the March 2006 Assembly of the UCSC Genome Browser, the size of the cited regions was determined to be 174,345 bp (62,082,000-62,256,344) and 66,289 bp (31,592,200-31,658,488), respectively (Figure 1). For these regions, no copy number variations (CNV) were found in the tested databases.

We also observed a copy number gain at the regions 8p23.3 (clone RP11-55E9 in case #1 and clone RP4-580L5 in case #3), 8p24.2 (clone RP11-184M21 in case #8 and clone RP11-17M8 in case #12) and 16p13.3 (clone RP11-616M22 in case #3 and clone RP11-304L19 in case #11) in 2 out of the 13 fetuses involving clones in close chromosomal regions.

Table 1 – Maternal age, side of the diaphragm defect, fetal source for G-banding, karyotype results, total number of abnormal clones and total number of abnormal clones encompassing described CNVs found in 13 fetuses with congenital diaphragmatic hernia.

Case #	Maternal age (years)	CDH side	Fetal material	Karyotype	N of abnormal clones	N of described CNVs
#1	32	PLR	Blood	46,XX	5	2
#2	28	PLL	Blood	46,XY	0	0
#3	36	PLL	Blood	46,XY	24	9
#4	26	PLL	Blood	46,XX	2	0
#5	30	PLL	Blood	46,XY	3	0
#6	21	PLL	Blood	46,XX	1	1
#7	20	PLL	LA	46,XY	6	2
#8	26	PLR	Blood	46,XX	32	12
#9	30	PLL	Blood	46,XY	0	0
#10	36	PLL	Blood	46,XX	5	2
#11**	19	PLL	Blood	46,XX	5	1
#12	36	PLL	LA	46,XY	139*	7
#13	35	PLL	LA	46,XX	2	0

PLR= posterolateral right PLL = posterolateral left

CNV = copy number variation

* Trisomy 13, (122 duplicated clones in chromosome 13).

** Non-isolated CDH.

Table 2 – Abnormal clones detected in 13 fetuses with CDH using whole genome CGH

Case #	G			L	
# 1	RP11-555E9*			RP11-239E10	
				RP1-103M22	
				RP11-257P3 *	
				RP11-22F2	
# 3	RP11-1197E19	RP4-580L5	RP11-616M22*	RP11-352A18	
	RP4-628J24	RP11-213G6	RP11-252A24*	RP11-1003	
	RP11-547D24	RP11-216L13	RP5-59D14*	RP1-273P12*	
	RP1-163M9*	GS-908-H22*	RP11-62C7	RP1-128O3*	
	RP11-73D11	CTD-2009H2	RP3-437O22	RP11-537K8	
	RP1-133H11	RP11-303I17	RP3-402G11*	RP11-300G13*	
# 4	RP11-79M19				
	RP11-744L17*				
# 5	RP11-625N16				
	RP11-52G4				
	RP11-79O9				
# 6	RP11-13C13*				
# 7	RP11-34I24			RP11-344A5*	
	RP11-90A15			RP11-765C10	
	RP11-69I22				
	RP11-311A12*				
# 8	RP11-121C9*	RP11-22L21	RP11-114P16	RP11-91M6*	
	RP11-477N3	RP11-164G6	RP11-79B13	RP11-63P12*	
	RP11-140B20*	RP11-957J11	RP11-61A21*	RP11-56H7	
	RP11-34N13	RP11-170D7	GS-227-L7*	RP11-81L17	
	RP11-91M18	RP11-184M21*	RP6-90M1	RP5-961O8	
	RP11-352E6*	CMB9-92L10	RP11-186N21*	RP3-424J12	
	RP11-29F10*	RP11-555G19	RP3-454M7		
	RP11-5K24	RP11-81G12*	RP11-533L19*		
	RP11-636B14	RP11-511H9			
# 10	RP11-90G17			RP11-1N7*	
				RP11-21A22*	
				RP11-720L3	
				RP11-354F21	
# 11	RP3-395M20	RP11-304L19			
	CITB-51J22	RP11-744L17*			
	RP11-18M11*				
# 12	RP11-20L17*	RP11-80F22*		RP11-69I22	RP11-375P13
	RP11-45N18*	RP1-141I3		RP11-348A21*	RP11-322K23
	RP11-776G16*	RP3-355C18*		RP11-537K8	RP11-20H21
	RP11-17M8*	ICRFC104A0359		RP1-232L22	RP11-59C12
# 13				RP1-19N1	
	RP11-63K6			RP11-80H6	

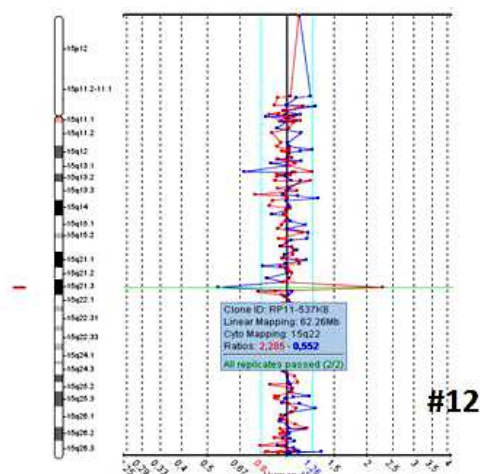
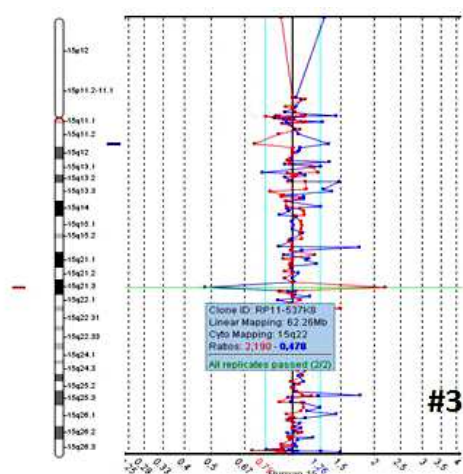
G = gain; L = loss.

* clones with described CNV.

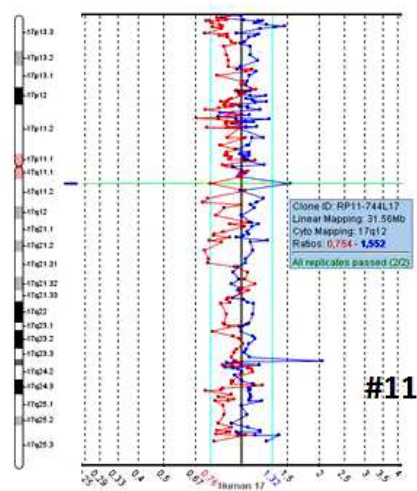
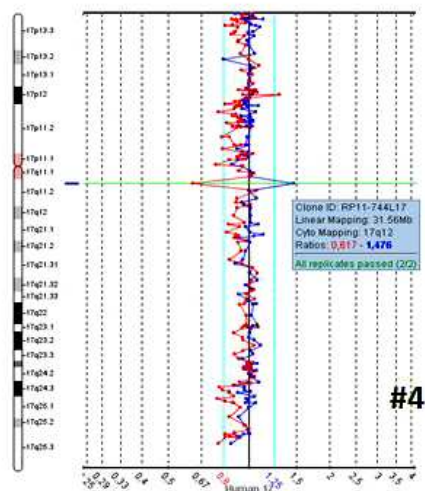
Cases #2 e #9 showed no abnormal clones.

Figure 1 – Spectral view of chromosome 15 showing the recurrent loss at 15q22 and chromosome 17 showing the recurrent gain at 17q12.

Del 15q22



Dup 17q12



Discussion:

We reported the molecular characterization of a group of fetuses with normal karyotype and diagnosis of CHD visible by ultra-sound prenatal care through a whole genome array CGH approach, to provide additional clues about the genetic etiology of CDH.

Molecular studies including array CGH to define CDH-critical chromosomal regions have been relatively few and recent. The known candidate genes and their chromosomal regions associated with human CDH are listed in Kantarci and Donahoe (2007). These include genes for transcription factors, molecules involved in cell migration, and extracellular matrix components.

Almost every chromosome has been reported to be involved with structural chromosomal anomalies in CDH cases (Holder et al. 2007). In the present study, the unique chromosomes that had not shown any copy number gains or losses were the chromosomes 19 and 20, reinforcing the finding showed in a recent review (Holder et al. 2007), where the sole chromosome without any description of structural abnormality was the chromosome 19. The chromosome 13 was involved in the case of complete trisomy and had not revealed submicroscopic imbalances in any other case presented here.

The main critical chromosomal regions involved with CDH cases are described at 15q26.2, 1q41-q42, 8p23.1 and 4p16.3 (Slavotinek et al. 2006). In the present study, there were three fetuses with some imbalances in these critical regions. One fetus with a deletion at 1q41-q42.13 (clone RP11-239E10), one fetus with a gain at 1q41 (clone RP11-121C9), and one fetus with a gain at 4p16.3 (clone RP11-1197E19).

The most cited CDH critical region is the 15q26, encompassing many candidate genes, in a well defined region of approximately 4Mb to 5Mb (Biggio et al. 2004; Klaassens et al. 2005; Slavotinek et al. 2006). Other possible chromosome regions are 15q24 e 15q22, encompassing genes that contribute to an altered retinoic acid signaling pathway involved in lung and diaphragm development. A total of 24 cases of diaphragm abnormalities associated with deletions of chromosome 15q24-qter have now been reported and have been estimated to account for up to 1% of patients with CDH (Klaassens et al. 2005). We failed to identify genomic imbalances neither at 15q26 nor at 15q24 in all 13 fetuses analyzed. But, nearby, in one case there was a deletion at 15q25.2 (clone RP11-81L17) and we identified a recurrent deletion in 15q22 (clone RP11-537K8) in two fetuses, not yet described.

We also observed gains at 8p23.3 and 8p24.2 regions involving different but close clones. Interstitial and terminal deletions at 8p23.1 had been reported as a candidate genomic change for cardiac and CDH genetic etiology (Holder et al. 2007; Wat et al. 2009). At least ten previously reported cases of CDH with deletions encompassing this region had already been evaluated at molecular level, nine of them having left sided CDH and one right sided (Wat et al. 2009). Among our cases, one out of 2 cases with 8p23.3 deletion and one with deletion at 8p24.2 region has a right sided CDH. Caution must be used in the interpretation of these findings because chromosome 8p contains many copy number variant regions whose potential contribution to the development of birth defects has not been adequately studied, making it difficult to determine if this deletion is indeed causal.

Interesting, a fetus that appeared to be normal at the G-banding karyotype in amniotic fluid, showed a complete trisomy through the array CGH testing. This fetus had an isolated form of CDH, with no other abnormalities identified in prenatal and neonatal evaluation. A boy was born at 36 weeks' gestation with 2800 g and Apgar scores of 8 and 9 at the first and 10th minutes respectively. Although intensive neonatal care, he died within 30 days of life, previously to the array CGH result. No autopsy evaluation was carried out. However, the possibility of a low-level mosaicism or a previously unidentified placental mosaicism can be pointed as probable causes, considering the complete absence of associated dysmorphic features in the affected fetus and the limitation of the G-banding technique in detecting these mosaicisms.

We could also find a recurrent gain at 17q12 (clone RP11-744L17) in 2 out of 13 cases analyzed. A Medline search could not find any citation about the relationship between CDH and this chromosomal region. Also, the finding of the gains at 16p13.3 (clones RP11-616M22 and RP11-304L19) in 2 out of the 13 fetuses has not been yet described. Additional research is needed to further establish the role of genes from this chromosome region in lung and diaphragm development and to determine the prevalence of copy number gain in the 17q12 and 16p13 regions among CDH patients.

There are evidences that CDH might have multiple molecular defects contributing to this same phenotype which explains why the defects might vary in severity (Kantarci & Donahoe 2007). In our study, there appears not to be a relationship between the number of genomic imbalances and the presence of other structural abnormalities. The sole fetus with

other abnormalities besides the CDH presented with 5 abnormal clones, while others fetuses with isolated malformation presented even with 24 and 32 detectable abnormalities.

The inheritance background of our findings is unknown as blood samples from the parents were not available for array CGH analysis to determine if the copy number aberrations were inherited or *de novo*. Even though, congenital diaphragmatic hernia is assumed to be a genetically heterogeneous disorder, and candidate genes cannot be determined solely by using linkage analysis of familial cases. For this type of disorder, the best way to determine which genes are involved is by analyzing a large number of patients for common aberrations by use of high resolution genetic methodologies, such as array CGH. Here, we contributed for this evaluation. Novel molecular analysis of CDH-critical chromosomal regions may ultimately define smaller regions and identify genes responsible for CDH. Subsequently, sequence analysis of genes mapped to this critical regions may reveal gene mutations and contribute to the identification of causative genes for CDH in human is a current goal as genetic treatment is a future challenger.

Microarray-based CGH is a powerful method to detect and analyze genomic imbalances that are well below the level of detection on banded karyotype analysis providing a better opportunity for genotype/phenotype correlations in other similarly affected individuals. Other advantages of this molecular method is that it does not involve cell culture, does not require prior knowledge of the genomic region involved and the ability to study cases where only DNA is available and no chromosomes can be obtained. The method was reproducible in a clinical standpoint, with reliable results within 48 hours. Thus, we could also reinforce the establishment of the technique of array CGH as an excellent tool for prenatal diagnosis. But, it is important to emphasize that array CGH may not replace karyotype analysis, but it can complement and expand current methods for a precise prenatal diagnosis and syndromes' characterization.

Based on our results, array CGH can detect detrimental submicroscopic changes that can be missed on routine chromosomal analysis, especially in prenatal samples where the band resolution may be compromised. It should help to better understand the etiology of CDH. Additional research is needed to further establish the role of genes from related chromosome regions. Moreover, in the future, prenatal screening for such chromosomal abnormalities could give better clues for predicting the outcome and provide more information for

recurrence risk counseling. Also, customized chips with markers across loci discovered should be designed for CDH and other complex disorders. Understanding such molecular pathways will permit one to conceive downstream replacement therapies, with ultimate aim of ameliorating or even preventing the severe CDH phenotypes.

Acknowledgments:

The authors have no conflict of interest with any of the information presented in this article. We are grateful to the families who participate in this research. We thank members of the Cell Culture and Cytogenetics Laboratory of the Integral Assistance for Women's Health of the State University of Campinas (CAISM –UNICAMP) for their contribution throughout the course of this project. This study was sponsored in part by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant No. 2007/04684-0) and in part by Fetal Medicine Foundation (FMF).

Electronic-Database Information:

The URL for data presented herein is as follows:

SpectralWare® v2.3.3 software (PerkinElmer Inc.), <http://service.spectralgenomics.com> (for the array analysis).

Database of Genomics Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/> (for CNV search)

Copy Number Variation, <http://cnv.chop.edu/> (for CNV search).

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/> (for physical mapping positions and size determination of chromosomal regions).

Medline, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (*for literature search*).

References:

- Biggio JJ, Descartes M, Carroll A, Holt R.2004. Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus?. *Am J Med Genet A* **126A**(2):183-5.
- Holder A, Klaassens M, Tibboel D, et al. 2007. Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet* **80**(5):825-45.

- Kantarci S, Donahoe P. 2007. Congenital diaphragmatic hernia (CDH) etiology as revealed by pathway genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **145C**(2):217-26.
- Klaassens M, van Dooren M, Eussen H, et al. 2005. Congenital diaphragmatic hernia and chromosome 15q26: determination of a candidate region by use of fluorescent in situ hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* **76**(5):877-82.
- Ng G, Huang J, Roberts I, Coleman N. 2006. Defining ploidy-specific thresholds in array comparative genomic hybridization to improve the sensitivity of detection of single copy alterations in cell lines. *J Mol Diagn* **8**(4):449-58.
- Pober B, Lin A, Russell M, et al. 2005. Infants with Bochdalek diaphragmatic hernia: sibling precurrence and monozygotic twin discordance in a hospital-based malformation surveillance program. *Am J Med Genet A* **138A**(2):81-8.
- Slavotinek A, Moshrefi A, Davis R, et al. 2006. Array comparative genomic hybridization in patients with congenital diaphragmatic hernia: mapping of four CDH-critical regions and sequencing of candidate genes at 15q26.1-15q26.2. *Eur J Hum Genet* **14**(9):999-1008.
- Vermeesch J, Melotte C, Froyen G, et al. 2005. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* **53**(3):413-22.
- Wat M, Shchelochkov O, Holder A, et al. 2009. Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A* **149A**(8):1661-77.
- Witters I, Legius E, Moerman P, et al. 2001. Associated malformations and chromosomal anomalies in 42 cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* **103**(4):278-82.

5. Discussão

Desde a descrição do número de cromossomos humanos há mais de 50 anos, existe um esforço científico para se definir a associação entre alterações cromossômicas, doenças genéticas e malformações congênitas. O desenvolvimento de modernas técnicas moleculares tem permitido a análise do genoma humano de alta resolução, especialmente úteis na identificação de novas alterações genômicas, previamente não identificáveis através da análise cromossômica de rotina.

Diante de um feto que apresenta malformações e estudo cromossômico normal é preciso ter muita cautela e evitar tentativas precipitadas de diagnóstico sindrômico. Mesmo após o nascimento, com o exame físico completo e exames complementares diversos, os centros especializados em diagnóstico dismórfico não conseguem estabelecer diagnóstico sindrômico definitivo em cerca metade dos pacientes (108). Para este grupo, as técnicas moleculares que envolvem estudos em nível genômico permitem a identificação de novos microarranjos cromossômicos possivelmente responsáveis pelo fenótipo anormal, contribuindo para a caracterização molecular e estabelecimento de um diagnóstico mais preciso, uma abordagem perinatal mais adequada e um aconselhamento genético mais detalhado.

Neste contexto, o presente estudo avaliou um grupo de fetos com malformações detectadas ultrassonograficamente e cariótipo normal, e um caso de anomalia cromossômica estrutural não conclusiva. O ANEXO 5 apresenta a caracterização do total de casos incluídos. Para o caso de alteração estrutural não conclusiva, a técnica de *array* CGH mostrou-se eficaz para o esclarecimento diagnóstico da origem, exata localização e dimensionamento do material adicional encontrado, atuando de forma complementar ao cariótipo convencional para uma definição diagnóstica. Para o grupo estudado, a taxa de detecção de instabilidades genômicas em fetos malformados pela técnica de *array* CGH foi de 93,7%, com 27% dos fetos apresentando alterações moleculares consideradas significativas, do ponto de vista citogenético e clínico.

A aplicabilidade clínica da técnica de *array* CGH parece bem estabelecida para o refinamento diagnóstico nos casos suspeitos ou com diagnósticos inconclusivos de alterações cromossômicas estruturais, conforme demonstrado pelo caso de material cromossômico adicional deste estudo. Na literatura recente, encontramos um crescente número de descrições de casos ou séries que vêm reforçar esta aplicabilidade clínica pré-natal do *array* CGH. Um grupo da Grécia publicou um caso bem semelhante ao descrito aqui, onde um feto apresentava no cariótipo convencional um material adicional de origem desconhecida no cromossomo 15, sendo identificado como uma trissomia parcial do braço curto do cromossomo 10 através de *array* CGH de BAC clones com 1Mb de resolução (109). Outras situações, para exemplificar, incluem o estudo de translocações supostamente balanceadas pelo cariótipo convencional, mas que revelaram seu padrão

desbalanceado ao *array* CGH (110) e o exato dimensionamento e localização cromossômica de anomalias estruturais (111).

Inesperadamente, identificamos uma trissomia completa do cromossomo 13 em um feto portador de hérnia diafragmática, cuja forma isolada foi confirmada após cuidadosa avaliação clínica neonatal, que incluiu avaliação por uma equipe de geneticistas clínicos com experiência em dismorfologia perinatal. Este feto foi submetido a tratamento intraútero com a colocação de balão endotraqueal, e evoluiu de forma inexplicavelmente insatisfatória do ponto de vista clínico, no período pós-natal. O cariótipo fetal pelas técnicas convencionais foi realizado a partir de amniócitos obtidos por amniocentese na 24ª semana de gestação, em laboratório privado. Conforme registro do laudo, foram avaliadas 20 células a uma resolução de 400-550 bandas. O resultado do *array* CGH foi disponibilizado para a equipe que prestava a assistência logo que concluído, porém, o recém-nascido evoluiu para óbito sem tempo hábil para nova amostragem. Infelizmente, os pais não autorizaram a necropsia e o serviço privado que realizou o cariótipo não disponibilizou o material utilizado para uma releitura do diagnóstico. Desta forma, não foi possível investigarmos as causas da discordância dos resultados citogenéticos. Contudo, a possibilidade de mosaicismos de baixo grau pode ser apontada como possível explicação, considerando a ausência de outros sinais dismórficos no feto acometido e as limitações das técnicas de análise microscópica dos cromossomos por bandamento G e *array* CGH na detecção destes mosaicismos.

Outra questão que podemos aqui ressaltar é a importância da necropsia perinatal, que poderia ter ajudado sobremaneira o estabelecimento do diagnóstico

neste caso. Fica evidente que as modernas técnicas diagnósticas disponíveis não podem abster-se da análise conjunta da investigação clássica das patologias perinatais, que inclui o estudo anatomopatológico e os registros radiográfico e fotográfico. Neste sentido, é necessária uma constante integração entre clínicos, geneticistas e patologistas, a fim de se alcançar um maior nível de consentimento familiar para o estudo *post mortem* (112).

Apesar de as técnicas de *array* CGH terem um princípio teórico e molecular comum, os estudos publicados apresentam diferentes metodologias na seleção de fetos, desenho do estudo, plataformas de *array* CGH, análises de bioinformática, e interpretação dos resultados, fazendo com que a comparação entre os diversos trabalhos não seja totalmente isenta de erros. Partindo deste princípio, este estudo considerou os estudos prévios para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos, mais do que na comparação dos mesmos.

Mesmo para interpretação dos resultados, ainda não existe um consenso entre os grupos de pesquisa. Um exemplo é que alguns trabalhos excluem da análise as instabilidades que coincidem com regiões de variações do número de cópias (CNV), enquanto outros trabalhos elegem estas anormalidades para o estudo dos progenitores. A definição de “resultados de significado incerto” também não é clara na metodologia adotada por alguns destes autores. Outra diferença com impacto significativo na comparação dos resultados apresentados encontra-se na seleção de fetos, que vai desde fetos que evoluíram a óbito com mais de três malformações a indicações diversas no âmbito do diagnóstico pré natal, como

ansiedade materna. Em um dos estudos foram incluídas 367 diferentes indicações para a análise molecular, incluindo 20 casos onde a indicação não era especificada.

Ao assumirmos os critérios de inclusão aqui empregados, obtivemos não um grupo aleatório de fetos malformados, mas um seletivo grupo, para o qual a hipótese de se encontrar alterações cromossômicas submicroscópicas era fortemente justificável na literatura. Isto parece explicar a alta taxa de amplificações e deleções genômicas encontradas pelo *array* CGH, em comparação com outros estudos.

Se por um lado, a criteriosa seleção dos fetos pode restringir a população para a qual as conclusões foram empregadas, por outro lado, aumenta a força estatística das mesmas. Outro diferencial que reforça as conclusões deste estudo é que utilizamos para a definição das malformações congênitas estudadas não somente os dados clínicos descritos nos formulários de pedidos médicos de cariotipagem, como na maioria dos trabalhos publicados, mas incluímos a confirmação clínica e/ou *post mortem* dos defeitos congênitos. Esta estratégia aumenta a força clínica das conclusões apresentadas.

Para a escolha da plataforma de *array* CGH, levamos em consideração os objetivos principais do estudo e optamos por uma cobertura genômica ampla, não direcionada para regiões conhecidamente envolvidas com síndromes de microdeleções ou microduplicações, em uma resolução moderada, que permitisse um grau aceitável de incerteza nas conclusões.

A cobertura da plataforma de *array* CGH, quando não direcionada, compreende regiões cromossômicas com e sem relevância clínica reconhecida.

Assim, à medida que se aumenta a resolução da plataforma, aumenta-se simultaneamente o grau de incertezas. Aqui surge o delicado equilíbrio entre a resolução do método, o potencial de diagnóstico clínico e a habilidade de interpretação dos resultados. Trata-se da questão-chave para determinar o uso do *microarray* CGH para fins diagnósticos na prática clínica. E esta questão é particularmente crítica para o diagnóstico pré-natal, onde a “normalidade” ou não do resultado define o prognóstico e a abordagem perinatal.

Porém, é preciso ressaltar que resultados incertos no campo do diagnóstico pré-natal exigem dos profissionais envolvidos uma constante reflexão. A ultrassonografia obstétrica, por exemplo, revolucionou a atenção pré-natal, mas não é isenta de resultados incertos para o rastreamento de malformações fetais (113). Também, a análise convencional microscópica dos cromossomos, técnica estabelecida na rotina para o diagnóstico pré-natal, pode revelar alterações com consequências clínicas discutíveis e de difícil interpretação. Da mesma forma, situações de resultados inconclusivos pelo *array* CGH representam desafios para a abordagem clínica, mas não um novo conceito em diagnóstico pré-natal.

A relação causal entre fenótipo e genótipo é uma meta pela qual a ciência médica tem lutado ao longo da sua história. O emprego das técnicas modernas de investigação genética das dismorfologias tem levado a descobertas moleculares em uma velocidade nunca antes observada, inaugurando o que os cientistas têm chamado de “terceira era da citogenética”. Para auxiliar os clínicos na correlação entre os achados fenotípicos e os achados genômicos das técnicas

moleculares ao redor do mundo, bancos de dados colaborativos de acesso público foram criados e estão disponíveis para pesquisa e discussão (107, 114).

Neste estudo, com o propósito de correlacionar os achados cromossômicos anormais com as malformações presentes em cada feto estudado, foram utilizadas três ferramentas eletrônicas de pesquisa citadas na seção Sujeitos e Método. Com esta metodologia, encontramos o total de 16 fetos (33,3% dos 48 fetos com cariótipo normal) nos quais havia pelo menos um relato na literatura de um mesmo defeito congênito e o envolvimento da mesma região cromossômica afetada pela anomalia encontrada no *array* CGH. Reconhecemos que a presença dessa associação comum com outro(s) caso(s) descrito(s) não determina a relação causal entre eles, embora os resultados deste estudo possam reforçar tal associação e estimular novas investigações. Talvez a única maneira de reforçar ou afastar as relações causais entre os microarranjos cromossômicos e o fenótipo específico seja a publicação de mais casos com os mesmos achados, antes de serem incluídos em estudos definitivos, porém altamente dispendiosos, como o sequenciamento gênico.

O aumento na cobertura das regiões genômicas nas plataformas de *array* CGH representativo do genoma inteiro é responsável por uma taxa adicional de 5% na detecção de microarranjos cromossômicos em comparação às plataformas de *array* CGH direcionado para regiões específicas (*target arrays*) (115). Entretanto, ao mesmo tempo em que as análises de alta resolução são capazes de identificar anomalias patológicas, elas incorrem na problemática da identificação de ganhos e perdas genômicas em regiões com significado clínico desconhecido. Uma

adequada discriminação entre as variações inofensivas e as verdadeiras aberrações é essencial para um aconselhamento adequado.

A identificação destas variações inofensivas complica sobremaneira a interpretação dos resultados das técnicas de *array* CGH. Neste estudo, 87% dos 45 fetos com alterações do número de cópias apresentaram pelo menos um clone alterado que continha, total ou parcialmente, uma região cromossômica com variações do número de cópias (CNV) descrito nos bancos de dados pesquisados. Esta porcentagem variou de 70 a 80% nos estudos que incluíram amostras pré-natais (vide Tabela 4 da publicação 2). Este achado sugere que para uma população mais selecionada de fetos com defeitos congênitos, a técnica de *array* CGH é capaz de aumentar a identificação de microarranjos cromossômicos sem incorrer em um aumento proporcional na detecção de achados de significado incerto.

As CNVs podem ser de difícil avaliação e interpretação. A variedade metodológica usada na geração das informações que formam os bancos de dados de pesquisa de CNVs disponíveis eletronicamente torna difícil discernir a exata extensão de cada provável CNV encontrada. Esta falta de uniformidade metodológica pode confundir a correta interpretação de um achado cromossômico anormal presente em um indivíduo fenotipicamente anormal, mas sobreposta total ou parcialmente a uma região com CNV descrita. Outro problema é o achado de um ganho em uma região onde está descrita uma deleção como CNV e vice-versa. Nestas situações, não há como inferir que o rearranjo também seja um achado benigno.

A identificação de CNVs também pode variar de acordo com a plataforma de *array* CGH empregada. Um estudo recente, testando os mesmos 20 pacientes, mostrou que o número encontrado de CNVs, utilizando-se a técnica de *array* CGH contendo BAC clones, foi maior quando comparado com os encontrados quando se aplicou *array* CGH de oligonucleotídeos (93). Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que os clones gerados de bactérias (BAC) são fragmentos maiores que as sondas de oligonucleotídeos, com a consequente sobreposição de regiões. Além disso, os BAC clones podem englobar regiões de DNA repetitivo, sabidamente associadas às variações do número de cópias (116).

A maioria dos trabalhos publicados até o momento utilizou o banco de dados *Database of Genomic Variants* (42) e alguns utilizaram também um banco de dados de CNV próprio, gerado a partir dos registros em suas instituições em particular, acumulados ao longo do tempo, em indivíduos fenotipicamente normais. Por se tratar de um estudo de caráter descritivo, optamos por utilizar dois bancos de dados de pesquisa de CNV e apresentar todos os CNVs encontrados, e não simplesmente excluí-los dos resultados.

Os grupos de estudiosos com maior experiência em *array* CGH para aplicação clínica empregam o estudo molecular sistemático de ambos os progenitores como um dos critérios para classificação das alterações cromossômicas encontradas como clinicamente significativas, CNVs sabidamente benignos e de significado clínico não conclusivo (99, 117). Uma avaliação combinada entre os achados laboratoriais, a avaliação clínica do feto por um especialista experiente em

dismorfologia fetal e o estudo da família parece ser a abordagem mais eficaz para os casos com diagnóstico inconclusivo, diminuindo suas consequências (117).

Entretanto, é necessário ressaltar que o estudo molecular dos pais implica triplicar o custo da investigação e, apesar de fornecer importantes informações para um completo diagnóstico, nem sempre é informativo. Quando a alteração é nova (de novo), a maioria dos rearranjos cromossômicos é considerada patológica, independentemente da sua dimensão. Entretanto, é preciso considerar que novas variações benignas podem surgir na população (118), o que não permite afirmar que um achado presente na prole e ausente nos progenitores seja a causa do quadro dismórfico. Da mesma maneira, a ocorrência de uma alteração cromossômica em um indivíduo com um defeito congênito e presente em pelo menos um dos pais considerado normal não deve excluir totalmente o efeito causal entre eles (119). Como exemplo temos os casos de deleção em 22q11.2 com repercussões fenotípicas na prole e pais portadores fenotipicamente normais (120, 121), e casos de microarranjos em 1q21.1 em crianças afetadas com pais sem alterações clínicas (95). Nestas circunstâncias, permanece a dúvida se a anomalia encontrada é uma CNV benigna ou uma variante patológica com penetrância incompleta ou com efeito de *imprinting*. Outro fator possivelmente confundidor é a certeza da paternidade.

O estudo aqui apresentado teve uma proposta mais de rastreamento das alterações cromossômicas, descrevendo-as em detalhes, do que de diagnóstico com finalidade clínica. Desta maneira, acreditamos que o fato de não ter incluído a avaliação molecular dos pais não invalidou os achados aqui discutidos. Em contrapartida, gerou uma proposta para o fluxograma de atendimento às famílias

com fetos malformados que inclua a coleta de amostras sanguíneas dos pais no momento da investigação fetal, ao constatar sua importância para futuras investigações.

Ao avaliarmos a dimensão e o conteúdo das regiões acometidas pelas alterações genômicas identificadas, em 13 dos 48 fetos estudados pelo CGH (27%) as amplificações ou deleções genômicas levariam a uma modificação do resultado citogenético inicial, com impacto clínico. Para estes casos, as implicações do diagnóstico molecular envolvem desde a referência para especialistas, a intervenção terapêutica para síndromes específicas, até o rastreamento de outras malformações. As implicações também se estendem no sentido da diminuição do número de procedimentos diagnósticos a que o paciente poderia ser submetido. Para a família, o diagnóstico pode diminuir a ansiedade e permitir um adequado aconselhamento de risco e planejamento para a futura prole. As alterações consideradas citogenética e clinicamente significativas variaram de 80Kb a 30Mb de dimensão e foram em sua maioria perdas genômicas (resultados discutidos no artigo 2). As características clínicas e moleculares dos 13 casos em questão estão resumidas no ANEXO 6.

A porcentagem de achados clinicamente significativos nos diversos trabalhos publicados envolvendo diagnóstico pré-natal varia de 1% a 5% (99, 100, 117, 122). Esta aparente discordância pode ser, em grande parte, explicada pelos diferentes critérios de inclusão dos fetos, bem como pelo fato de terem sido utilizadas diferentes plataformas de *array* CGH que variam desde os *targeted arrays* com 300 BAC clones até *arrays* de oligonucleotídeos. Somam-se aqui as diferenças nos critérios de interpretação dos resultados e diferenças na definição de casos considerados clinicamente significativos já mencionados anteriormente.

Entretanto, ao avaliarmos os resultados publicados, fica aparente que a maioria dos casos em que as perdas e ganhos genômicos foram considerados clinicamente significativos correspondiam aos casos cuja indicação para o estudo através de *array* CGH era a presença de malformações identificadas pela ultrassonografia obstétrica, o que poderia explicar a alta taxa encontrada no presente estudo. Ao avaliarem 182 fetos, associando uma plataforma de 4670 BAC clones e um *array* de oligonucleotídeos, Coppinger *et al.* (117) encontraram alterações consideradas clinicamente significativas em sete casos (3,8%), dos quais seis foram incluídos devido a alterações ultrassonográficas.

Novos estudos são necessários para a validação da aplicabilidade clínica dos *arrays* de CGH para as diferentes situações clínicas do diagnóstico pré-natal, como idade materna avançada, rastreamento bioquímico alterado, marcadores ultrassonográficos de primeiro trimestre alterados e nas situações de ansiedade da família na presença de rastreamento ultrassonográfico ou bioquímico normais (123). Ao avaliar separadamente os grupos de gestações acima mencionados, poderemos concluir se de fato a principal aplicação clínica do *array* CGH é a investigação de fetos com alterações estruturais diagnosticadas pela ultrassonografia obstétrica ou se o efeito observado é consequência da maior representação deste grupo de fetos nas casuísticas publicadas.

Entre os clones alterados com CNV descritos e os clones alterados para os quais não foi encontrada uma correlação clínica entre a região cromossômica que representam e o defeito congênito apresentado pelo feto, encontramos algumas situações especiais cujo significado foi considerado incerto, perfazendo o total de

114 clones (28% dos 406 clones alterados). Dentre estes, encontram-se os clones que se mostraram recorrentes em pelo menos dois fetos com a mesma malformação. Estes clones parecem apontar regiões cromossômicas de interesse para um estudo confirmatório e de correlação genótipo/fenótipo. O ANEXO 7 apresenta a lista de clones alterados classificados e separados dentro dos grupos de malformações fetais.

Quanto à distribuição cromossômica, a maior e a menor prevalência das instabilidades genômicas foi encontrada no cromossomo 1 (21 fetos = 44%) e cromossomo 21 (2 casos = 4%), respectivamente. Uma possível explicação para este achado coincide com o fato de serem estes o maior e o menor cromossomo do genoma humano. Da mesma forma, o braço longo esteve mais frequentemente envolvido nos casos clinicamente significativos (10 dos 13 casos), podendo também ser este achado coincidente com sua maior dimensão em relação ao braço curto. No entanto, não há evidências suficientes para se excluir outros mecanismos moleculares como possíveis explicações para estes achados.

O desenvolvimento de uma plataforma útil para o diagnóstico na prática clínica deve ser confiável, tecnicamente factível, efetivo na detecção das anormalidades cromossômicas e deve fornecer resultados capazes de serem interpretados. Como ocorre para a introdução na prática clínica de qualquer nova técnica para diagnóstico relacionado a doenças genéticas, para a técnica de *array* CGH ser incluída na prática rotineira requerem-se estratégias concomitantes, como treinamento dos clínicos para interpretação dos resultados e adequação do aconselhamento genético, e educação da população e da mídia em relação aos usos e abusos da técnica introduzida. Estas estratégias, dentre outras,

permitem a adequada implantação do teste, com o máximo de benefícios que ele oferece e com o mínimo risco de interpretações errôneas que poderiam gerar ansiedade e condutas médicas não pertinentes ao caso, com sequelas irreparáveis nos âmbitos bio-psico-social da família envolvida.

A abordagem cuidadosa e prudente do diagnóstico clínico está em contraste com o mundo mais exploratório da pesquisa. Para fins de pesquisa, os *arrays* de oligonucleotídeos ou cDNA com cobertura ampla do genoma são um excelente instrumento para a identificação de instabilidades genômicas novas ou encobertas, regiões com genes candidatos, caracterização de pontos de quebra e associação com pontos de mutação. Entretanto, essas plataformas ainda não são apropriadas para a prática clínica (82), uma vez que a quantidade de informações sem significado esclarecido não contribui para a elaboração de um plano de abordagem clínica e pode, inversamente, confundi-la. Até o momento, o *array* CGH de oligonucleotídeos ainda não se provou vantajoso em relação aos protocolos com BAC clones para o diagnóstico pré-natal (124).

Para pesquisa científica, a técnica de *array* CGH está apenas começando a descobrir sua potencialidade. Para fins diagnósticos, torna-se necessária uma reflexão mais aprofundada da sua utilidade imediata. Como cada amostra clínica não pode ser considerada um projeto de pesquisa, os *arrays* devem ser construídos de maneira a maximizar a capacidade diagnóstica enquanto minimiza os resultados falso-positivos, a fim de fornecer aos clínicos diagnósticos e informações com as quais eles terão que conduzir a atenção ao indivíduo com alterações cromossômicas detectadas. Entretanto, o alto custo do método ainda é uma limitação importante

para a indicação de seu uso na rotina clínica, estando confinado a centros de pesquisa e laboratórios privados. Comparativamente, o custo do *array* CGH é vinte vezes maior que o custo do cariótipo convencional, desconsiderando as taxas de importação e o custo do scanner de lâminas. Para este estudo, o custo foi determinante para a definição do tamanho amostral e para a opção de não investigação dos pais biológicos para os 13 casos com alterações moleculares mais significativas. A investigação dos pais para os treze casos citados implicaria em um aumento de 50% no financiamento, inviabilizando o mesmo.

Apesar dos desafios ainda a serem vencidos, é evidente que a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos vem afirmando-se como uma ferramenta valiosa na identificação e caracterização molecular das anomalias cromossômicas em fetos com defeitos congênitos, abrindo um novo capítulo na interface histórica entre a Citogenética Clínica e a Medicina Fetal.

Este estudo apresenta a primeira experiência brasileira de utilização da técnica de *array* CGH na área de Medicina Fetal, introduzindo a discussão sobre a adequação da técnica para nossa realidade e trazendo novas propostas para os serviços que atendem fetos com defeitos congênitos. Os achados aqui apresentados, além de contribuírem com os estudos de caracterização molecular de quadros dismórficos, podem colaborar para reforçar ou apontar regiões cromossômicas com suspeita de envolvimento nas malformações fetais prevalentes em um laboratório de rotina de citogenética, podendo, em última análise, auxiliar na seleção de clones a ser incluídos em plataformas de *array* CGH específicas para o diagnóstico pré-natal.

6. Conclusões

- A técnica de hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array* CGH) foi aplicada com sucesso para o grupo de fetos malformados encaminhados para estudo citogenético em um laboratório de rotina de citogenética, atuando de forma complementar e apontando novas propostas de abordagem.
- A técnica de *array* CGH contribuiu com a caracterização molecular dos quadros dismórficos apresentados pelos fetos estudados, podendo identificar com precisão a origem e a localização cromossômica das instabilidades genômicas.
- A caracterização do perfil genômico de fetos com defeitos congênitos, por *array* CGH, permitiu complementar o diagnóstico citogenético convencional, mostrando alterações que não puderam ser detectadas devido ao nível de resolução obtido com o bandamento G convencional e que levaram a uma mudança no diagnóstico citogenético em 27% dos 48 fetos estudados.

- A caracterização do padrão genômico de perdas e ganhos para algumas malformações fetais específicas permitiu a identificação de regiões cromossômicas provavelmente envolvidas com sua etiologia e que necessitam ser mais exhaustivamente testadas em futuras pesquisas moleculares, podendo auxiliar na seleção de clones para serem incluídos em técnicas de hibridização *in situ*, até plataformas de *array* CGH específicas para o diagnóstico pré-natal.

7. Referências Bibliográficas

1. Opitz JM, Wilson GN. Causes and pathogenesis of birth defects. In: Gilbert-Barness E, Kapur R, Oligny LL, Siebert J (editors). Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child. Elsevier Mosby; 1997.
2. Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS. Prevenção e controle de enfermidades genéticas e defeitos congênitos: relatório de um grupo de consulta. Washington DC: Publicação científica 460; 1984.
3. Penchaszadeh V, Christianson A, Giugliani R, Boulyjenkov V, Katz M. Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. Community Genet. 1999;2(4):196-201.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FNS. Manual de Instruções para o Preenchimento da Declaração de Nascido Vivo. Brasília. 2001.
5. Guerra F, Llerena JJ, Gama S, Cunha C, Theme Filha M. Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). Cad Saude Publica. 2008 Jan;24(1):140-9.
6. De Galan-Roosen A, Kuijpers J, Meershoek A, van Velzen D. Contribution of congenital malformations to perinatal mortality. A 10 years prospective regional study in The Netherlands. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1998; Sep;80(1):55-61.
7. Rosano A, Botto L, Botting B, Mastroiacovo P. Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. J Epidemiol Community Health. 2000; Sep;54(9):660-6.

8. Cornel M. Wealth and health in relation to birth defects mortality. *J Epidemiol Community Health*. 2000; Sep;54(9):644.
9. Horovitz D, Llerena Jr. J, Mattos R. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(4):1055-64.
10. Brasil. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Disponível em URL: <http://www.datasus.gov.br> [Acesso em 22/12/2009].
11. Quayle J. Repercussões Psicológicas: Parentalidade e Medicina Fetal. In: Zugaib M, Pedreira DA, Brizot ML, Bunduki V. *Medicina Fetal*. 2a. ed. São Paulo. Rio de Janeiro. Belo Horizonte: Atheneu; 1999. p. 33-48.
12. Benacerraf B, Frigoletto FJ, Greene M. Abnormal facial features and extremities in human trisomy syndromes: prenatal US appearance. *Radiology*. 1986; Apr;159(1):243-6.
13. Carrera J, Torrents M, Mortera C, Cusí V, Muñoz A. Routine prenatal ultrasound screening for fetal abnormalities: 22 years' experience. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1995 Mar;5(3):174-9.
14. Snijders R, Sebire N, Nicolaides K. Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther*. 1995; 10(6):356-67.
15. Snijders R, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides K. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999; Mar;13(3):167-70.
16. Nicolaides K, Snijders R, Gosden C, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet*. 1992; Sep;340(8821):704-7.
17. Barini R, Stella JH, Ribeiro ST, Luiz FB, Isfer EV, Sanchez RC et al. Desempenho da Ultrassonografia Pré-natal no Diagnóstico de Cromossomopatias Fetais em Serviço Terciário. *RBGO*. 2002;24(2):121-7.

18. Boue A, Muller F, Briard M, Boue J. Interest of biology in the management of pregnancies where a fetal malformation has been detected by ultrasonography. *Fetal Ther.* 1988;3(1-2):14-23.
19. Wladimiroff J, Sachs E, Reuss A, Stewart P, Pijpers L, Niermeijer M. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities in the presence of fetal structural defects. *Am J Med Genet.* 1988; Feb;29(2):289-91.
20. Gonen R, Dar H, Degani S. The karyotype of fetuses with anomalies detected by second trimester ultrasonography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; Feb;58(2):153-5.
21. Zeitune M, Aitken D, Crossley J, Yates J, Cooke A, Ferguson-Smith M. Estimating the risk of a fetal autosomal trisomy at mid-trimester using maternal serum alpha-fetoprotein and age: a retrospective study of 142 pregnancies. *Prenat Diagn.* 1991; Nov;11(11):847-57.
22. Jacobs P, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992; Feb;29(2):103-8.
23. Jackson L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol.* 2002; Sep;45(3):622-39; discussion 730-2.
24. Nelson K, Holmes L. Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. *N Engl J Med.* 1989; Jan;320(1):19-23.
25. Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet.* 2006; Apr;43(4):353-61.
26. Farah SB. *DNA: Segredos e Mistérios*. 1ª. ed. revisada. São Paulo: Sarvier; 2000. 276p.
27. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. 7ª ed. Philadelphia: Elsevier.; 2008. 640p.

28. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. New York: Willey-Liss.; 2000. 576 p.
29. Shaw C, Lupski J. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Hum Mol Genet. 2004 Apr;13 Spec No 1:R57-64.
30. Shaffer L, Lupski J. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Annu Rev Genet. 2000;34:297-329.
31. Patsalis P. Complex chromosomal rearrangements. Genet Couns. 2007;18(1):57-69.
32. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G et al. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. J Med Genet. 2000 Nov;37(11):858-65.
33. Langer S, Fauth C, Rocchi M, Murken J, Speicher M. AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. Hum Genet. 2001 Aug;109(2):152-8.
34. Yaron Y, Carmon E, Goldstein M, Voskoboinik N, Ochshorn Y, Gelman-Kohan Z et al. The clinical application of spectral karyotyping (SKY) in the analysis of prenatally diagnosed extra structurally abnormal chromosomes (ESACs). Prenat Diagn. 2003 Jan;23(1):74-9.
35. Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C et al. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. Hum Genet. 1997 Jun;99(6):761-5.
36. Mikhaail-Philips M, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin R. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. Am J Med Genet A. 2004 Jun;127A(2):139-43.

37. Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M et al. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*. 2006 Aug;38(4):122-7.
38. Kowalczyk M, Srebniak M, Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences. *J Appl Genet*. 2007;48(2):157-66.
39. Twyman R. Mutation or polymorphism? [on-line] 2003.[Acesso em 30/06/2009]. Disponível em URL: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html
40. Feuk L, Marshall C, Wintle R, Scherer S. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*. 2006 Apr;15 Spec No 1:R57-66.
41. Redon R, Ishikawa S, Fitch K, Feuk L, Perry G, Andrews T et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006 Nov;444(7118):444-54.
42. Database of Genomic Variants. [on-line database]. Canada/Ontario Genomics Institute, the McLaughlin Centre for Molecular Medicine, the Wellcome Trust and the Canadian Institutes for Health Research. Disponível em URL: <http://projects.tcag.ca/variation/>.
43. Copy Number Variation. [on-line database]. Children's Hospital of Philadelphia (CHOP). Disponível em URL: <http://cnv.chop.edu/>.
44. Caspersson T, Farber S, Foley G, Kudynowski J, Modest E, Simonsson E et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*. 1968 Jan;49(1):219-22.
45. ISCN (2009). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG, S Lovak ML, Campbell LJ (editors). S. Karger, Basel, 2009.
46. Rogatto S. Citogenética sem Risco: Biossegurança e Garantia de Qualidade. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP; 2000. 170p.

47. Cabral ACV, Machado IN, Leite HV, Pereira AK, Vitral Z. Cariótipo Fetal em Líquido Pleural Obtido por Toracocentese. RBGO. 2001;23(4):243-6.
48. Vissers L, Veltman J, van Kessel A, Brunner H. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. Hum Mol Genet. 2005 Oct;14 Spec No. 2:R215-23.
49. Carpenter N. Molecular cytogenetics. Semin Pediatr Neurol. 2001 Sep;8(3):135-46.
50. Haddad B, Schröck E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith M et al. Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. Hum Genet. 1998 Nov;103(5):619-25.
51. Fan Y, Siu V, Jung J, Xu J. Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. Genet Test. 2000;4(1):9-14.
52. Speicher M, Gwyn Ballard S, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet. 1996 Apr;12(4):368-75.
53. Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. Hum Genet. 1997 Dec;101(3):255-62.
54. Smith L, Nagar S, Kim G, Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. Health Phys. 2003 Jul;85(1):23-9.
55. Ryall R, Callen D, Cocciolone R, Duvnjak A, Esca R, Frantzis N et al. Karyotypes found in the population declared at increased risk of Down syndrome following maternal serum screening. Prenat Diagn. 2001 Jul;21(7):553-7.
56. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992 Oct;258(5083):818-21.
57. Albertson D, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. Hum Mol Genet. 2003 Oct;12 Spec No 2:R145-52.

58. Weiss M, Kuipers E, Meuwissen S, van Diest P, Meijer G. Comparative genomic hybridisation as a supportive tool in diagnostic pathology. *J Clin Pathol*. 2003 Jul;56(7):522-7.
59. Weiss M, Kuipers E, Postma C, Snijders A, Siccama I, Pinkel D et al. Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival. *Oncogene*. 2003 Mar;22(12):1872-9.
60. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet*. 2001 Nov;38(11):740-4.
61. Ness G, Lybaek H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet*. 2002 Nov;113(2):125-36.
62. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet*. 1995 Nov;57(5):1211-20.
63. Yu L, Moore Dn, Magrane G, Cronin J, Pinkel D, Lebo R et al. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry*. 1997 Jul;28(3):191-7.
64. Lapierre J, Cacheux V, Collot N, Da Silva F, Hervy N, Rivet D et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet*. 1998;41(3):133-40.
65. Thein A, Charles A, Davies T, Newbury-Ecob R, Soothill P. The role of comparative genomic hybridisation in prenatal diagnosis. *BJOG*. 2001 Jun;108(6):642-8.
66. Heinrich JK, Machado IN, Vivas L, Bianchi MO, Andrade KC, Sbragia L et al. Prenatal genomic profiling of abdominal wall defects through comparative genomic hybridization: perspectives for a new diagnostic tool. *Fetal Diagn Ther*. 2007;22(5):361-4.

67. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Döhner H et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Aug;25(4):410-3.
68. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407.
69. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):207-11.
70. Telenius H, Carter N, Bebb C, Nordenskjöld M, Ponder B, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992 Jul;13(3):718-25.
71. Pollack J, Perou C, Alizadeh A, Eisen M, Pergamenschikov A, Williams C et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):41-6.
72. Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M et al. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res*. 2003 Oct;13(10):2291-305.
73. Mantripragada K, Tapia-Páez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski J. DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med*. 2004 Feb;13(2):273-9.
74. Ishkanian A, Malloff C, Watson S, DeLeeuw R, Chi B, Coe B et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet*. 2004 Mar;36(3):299-303.
75. Coe B, Lockwood W, Chari R, Lam W. Comparative genomic hybridization on BAC arrays. *Methods Mol Biol*. 2009;556:7-19.

76. Shaikh T. Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med*. 2007 Sep;9(9):617-25.
77. Vermeesch J, 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 Mar;53(3):413-22.
78. Ballif B, Rorem E, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A*. 2006 Dec;140(24):2757-67.
79. Cheung S, Shaw C, Scott D, Patel A, Sahoo T, Bacino C et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A*. 2007 Aug;143A(15):1679-86.
80. Shinawi M, Shao L, Jeng L, Shaw C, Patel A, Bacino C et al. Low-level mosaicism of trisomy 14: phenotypic and molecular characterization. *Am J Med Genet A*. 2008 Jun;146A(11):1395-405.
81. Wood E, Dowey S, Saul D, Cain C, Rossiter J, Blakemore K et al. Prenatal diagnosis of mosaic trisomy 8q studied by ultrasound, cytogenetics, and array-CGH. *Am J Med Genet A*. 2008 Mar;146A(6):764-9.
82. Bejjani B, Saleki R, Ballif B, Rorem E, Sundin K, Theisen A et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A*. 2005 Apr;134(3):259-67.
83. Cheung S, Shaw C, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med*. 2005 Jul-Aug;7(6):422-32.
84. Shaffer L, Kashork C, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif B et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr*. 2006 Jul;149(1):98-102.

85. Lu X, Shaw C, Patel A, Li J, Cooper M, Wells W et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One*. 2007;2(3):e327.
86. Stankiewicz P, Beaudet A. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Jun;17(3):182-92.
87. Vissers L, de Vries B, Osoegawa K, Janssen I, Feuth T, Choy C et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003 Dec;73(6):1261-70.
88. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 2004 Apr;41(4):241-8.
89. Gribble S, Prigmore E, Burford D, Porter K, Ng B, Douglas E et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet*. 2005 Jan;42(1):8-16.
90. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid B, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet*. 2005 Sep;42(9):699-705.
91. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante A, Sloos W, Otto P et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet*. 2006 Feb;43(2):180-6.
92. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet*. 2006 Aug;43(8):625-33.

93. Aradhya S, Manning M, Splendore A, Cherry A. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2007 Jul;143A(13):1431-41.
94. Pickering D, Eudy J, Olney A, Dave B, Golden D, Stevens J et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet Med*. 2008 Apr;10(4):262-6.
95. Brunetti-Pierri N, Berg J, Scaglia F, Belmont J, Bacino C, Sahoo T et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1466-71.
96. Sharkey F, Maher E, FitzPatrick D. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child*. 2005 Dec;90(12):1264-9.
97. Schaeffer A, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter D, Lese Martin C. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet*. 2004 Jun;74(6):1168-74.
98. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, Jacquemont S, Joubert M, David A et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet*. 2005 Feb;42(2):121-8.
99. Van den Veyver I, Patel A, Shaw C, Pursley A, Kang S, Simovich M et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn*. 2009 Jan;29(1):29-39.
100. Kleeman L, Bianchi D, Shaffer L, Rorem E, Cowan J, Craigo S et al. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn*. 2009 Dec;29(13):1213-7.

101. Crane J, LeFevre M, Winborn R, Evans J, Ewigman B, Bain R et al. A randomized trial of prenatal ultrasonographic screening: impact on the detection, management, and outcome of anomalous fetuses. The RADIUS Study Group. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Aug;171(2):392-9.
102. Castilha E, Lopez-Camelo J, IM O. Prevencion primaria de los defectos congénitos. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1996.
103. Grubbs S, Brundage S. Preconception management of chronic diseases. *J S C Med Assoc.* 2002 Oct;98(6):270-6.
104. Hanlin R. Congenital infections and preconception counseling. *J S C Med Assoc.* 2002 Oct;98(6):277-80.
105. Pubmed. [on-line database]. Disponível em URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/.
106. Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM. [on-line database]. Disponível em URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
107. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources – DECIPHER. [on-line database]. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK. V4.3. Disponível em URL: <http://decipher.sanger.ac.uk>
108. Stevenson RE. Causes of congenital anomalies: an overview and historical perspective. In: Stevenson RE HJ, Goodman RM, editor. *Human malformations and related anomalies.* New York: Oxford University Press; 1993. p. 3-20.
109. Kitsiou-Tzeli S, Sismani C, Karkaletsis M, Florentin L, Anastassiou A, Koumbaris G et al. Prenatal diagnosis of a de novo partial trisomy 10p12.1-12.2 pter originating from an unbalanced translocation onto 15qter and confirmed with array CGH. *Prenat Diagn.* 2008 Aug;28(8):770-2.
110. Simovich M, Yatsenko S, Kang S, Cheung S, Dudek M, Pursley A et al. Prenatal diagnosis of a 9q34.3 microdeletion by array-CGH in a fetus with an apparently balanced translocation. *Prenat Diagn.* 2007 Dec;27(12):1112-7.

111. Chen C, Tzen C, Chern S, Tsai F, Hsu C, Lee C et al. A 12 Mb deletion of 6p24.1-->pter in an 18-gestational-week fetus with orofacial clefting, the Dandy-Walker malformation and bilateral multicystic kidneys. *Eur J Med Genet.*52(1):59-61.
112. Lana AMA, Machado IN, Leite HV, Cabral ACV. Exame *post mortem* de fetos e neonatos acompanhados pelo Centro de Medicina Fetal do HC/UFGM: casuística de 11 anos. In: V Encontro Nacional de Medicina Fetal; 2000, São Paulo.
113. Goldberg J. Routine screening for fetal anomalies: expectations. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004 Mar;31(1):35-50.
114. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations – ECARUCA. [on-line database]. European Cytogeneticists Association (ECA). Disponível em URL: <http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>.
115. Baldwin E, Lee J, Blake D, Bunke B, Alexander C, Kogan A et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008 Jun;10(6):415-29.
116. Sharp A, Locke D, McGrath S, Cheng Z, Bailey J, Vallente R et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):78-88.
117. Coppinger J, Alliman S, Lamb A, Torchia B, Bejjani B, Shaffer L. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn.* 2009 Dec;29(12):1156-66.
118. Lupski J. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7 Suppl):S43-7.

119. Shaffer L, Bejjani B, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif B. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007 Nov;145C(4):335-45.
120. Wilson D, Goodship J, Burn J, Cross I, Scambler P. Deletions within chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet*. 1992 Sep;340(8819):573-5.
121. McDonald-McGinn D, Tonnesen M, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll D, Emanuel B et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med*.3(1):23-9.
122. Shaffer L, Coppinger J, Alliman S, Torchia B, Theisen A, Ballif B et al. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn*. 2008 Sep;28(9):789-95.
123. Pergament E. Controversies and challenges of array comparative genomic hybridization in prenatal genetic diagnosis. *Genet Med*. 2007 Sep;9(9):596-9.
124. Bi W, Breman A, Venable S, Eng P, Sahoo T, Lu X et al. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenat Diagn*. 2008 Oct;28(10):943-9.

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Ficha clínica

Idade materna: _____

DUM: ____/____/____

HF de malformações congêntas:

Achados ultrassonográficos:

USG: Data : ____/____/____

IG (US): _____ semanas

IG (DUM): _____ semanas

CASO n.º: _____

G ____ P ____ A ____

Achados dismórficos:

--

TÉRMINO DA GESTAÇÃO:

() parto () abortamento IG: ____ semanas Data: ____/____/____

Achados dismórficos do RN: _____

RESULTADOS CITOGENÉTICOS:

Data da coleta: ____/____/____

Material estudado: () sangue de cordão () líquido amniótico

Resultado do cariótipo convencional: _____

Número de células avaliadas: _____

Data do resultado: ____/____/____

NOME: _____

DN: ____/____/____

REGISTRO SAME (HC): _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONES : _____ - _____

8.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, _____ anos, RG _____, endereço _____, telefone ____-_____, HC _____, aceito colaborar como voluntária em um estudo que vai tentar identificar alterações na estrutura dos cromossomos do meu bebê.

Fui informada que não haverá necessidade de nenhum procedimento médico a mais, além do que já havia autorizado para o estudo do cariótipo, para fins deste estudo. Fui informada também que, caso não queira participar ou desista após ter concordado em participar, isso não prejudicará meu atendimento atual ou futuro na UNICAMP. Estou ciente de que material retirado do meu bebê poderá não ser completamente utilizado no estudo (se sobrar ou for excluído do estudo). Este material poderá ser descartado (jogado fora) ou armazenado para ser utilizado em futuras pesquisas, dependendo de minha autorização e da aprovação pelo CEP/FCM/UNICAMP.

Tenho direito a solicitar esclarecimentos de dúvidas sobre a pesquisa em qualquer momento, contactando a Dra. Isabela pelo telefone (19) 9107 8800. Poderei também contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP/FCM/UNICAMP) pelo telefone (19) 3521 8936.

Sim, aceito participar do estudo e **SIM**, autorizo o armazenamento do material que sobrar.

(Paciente ou seu representante legal, RG: _____)

Sim, aceito participar do estudo e **NÃO** autorizo o armazenamento do material que sobrar.

(Paciente ou seu representante legal, RG: _____)

Dra. Isabela Nelly Machado: _____
Campinas, _____ de _____ de 20 _____.

8.3. Anexo 3 – Normas de Armazenamento de Material Biológico Humano no Âmbito de Projeto de Pesquisa

LABORATÓRIOS CLÍNICOS ESPECIALIZADOS – CAISM

Citogenética e Cultivo Celular, Marcadores Biológicos e Biologia Molecular, Microbiologia, Patologia Clínica.

Normas para armazenamento de material biológico humano no âmbito de projeto de pesquisa.

1. O LCE (Laboratórios Clínicos Especializados) é composto por quatro setores laboratoriais: citogenética e cultivo celular, marcadores biológicos e biologia molecular, microbiologia e patologia clínica. Fica sob a responsabilidade dos coordenadores setoriais, em consonância com o chefe dos Laboratórios Clínicos Especializados (LCE) a guarda e autorização para utilização de todo e qualquer material biológico humano armazenado no laboratório.
2. O armazenamento de materiais biológicos humanos no LCE e em seus setores justifica-se na necessidade e oportunidade de realizar novas pesquisas no futuro.
3. Só serão armazenadas amostras de material biológico humano quando provida de “Consentimento Livre Esclarecido” assinado pelo sujeito doador e, no qual esteja incluída de forma clara, a informação de que está previsto o armazenamento de amostras para uso em pesquisas futuras.
4. A utilização do material biológico humano armazenado atenderá, exclusivamente, os objetivos ou aplicações descritas em projetos de pesquisas aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição.
5. O sigilo e respeito à confidencialidade, bem como a possibilidade de rastreamento dos dados e da origem das amostras serão garantidos por um sistema de codificação.
6. O sistema de codificação das amostras será definido pelo responsável pela guarda do material biológico juntamente com o pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa que gerou a necessidade de armazenamento da amostra.
7. A possibilidade de contato com os doadores para fornecimento de informação de seu interesse (por exemplo, resultados de exames para acompanhamento clínico ou aconselhamento genético) ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa será garantida pelos dados cadastrais dos sujeitos mantidos pela instituição onde a pesquisa é realizada.
8. Os materiais biológicos armazenados no laboratório serão mantidos, em princípio, pelo período de 5 anos a partir da colheita da amostra. O prolongamento do período de armazenamento das amostras dependerá da autorização do CEP, mediante a solicitação do depositário, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.
9. O material biológico humano criopreservado será depositado em sistema de congelamento validado, observando um local fixo e pré-determinado que permite a sua localização com facilidade, rapidez e segurança.
10. Será mantido um registro das condições dos congeladores ou dos contêineres de armazenamento, documentando a temperatura ou o nível de nitrogênio.

8.4. Anexo 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 31/01/07.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 683/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0551.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA POR HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH) EM FETOS DISMÓRFICOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Isabela Nelly Machado

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/11/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 04/12/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a aplicabilidade do método de CGH (Comparative Genomic Hybridization) em material fetal para o diagnóstico de perdas e ganhos genômicos em fetos dismórficos com cariótipo normal.

III - SUMÁRIO

Estudo prospectivo, descritivo, onde 90 casos de gestações com feto dismórficos e cariótipo normal serão analisadas. Serão coletados 2 amostras de sangue fetal ou uma amostra de 10 ml de líquido amniótico para obtenção do material fetal. Será realizado o cariótipo convencional por bandeamento G e o CGH.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido estão adequados. A pesquisadora respondeu adequadamente às questões solicitadas pelos assessores. Foi incluído o plano de aconselhamento genético que será realizado pela Dra. Denise Cavalcanti.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

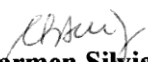
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Extraordinária do CEP/FCM, em 04 de dezembro de 2006.


Prof. Dr.ª. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.5. Anexo 5 – Resumo das características clínicas, citogenéticas e concentração de DNA extraído dos 49 fetos incluídos no estudo

Caso	Cariótipo Convencional	[DNA] ng/μl	Idade Materna	Idade Gestacional	Alterações ultrassonográficas / Anomalias congênitas
#1	46,XX	341	32	38	HDC
#2	46,XY	46	28	23	HDC
#3	46,XY	159	36	22	HDC
#4	46,XX	182	26	24	HDC
#5	46,XX	151	19	23	HDC, Onfalocele, cardiopatia, RCIU
#6	46,XY	471	36	36	HDC
#7	46,XY	98	21	27	DW,DE,ACC,fenda labial, ascite, cardiopatia, hidrocele, micropênis, RCIU
#8	46,XX	65	29	26	DW, cardiopatia, RCIU
#9	46,XX,add(4)	239	19	28	DW, Hidropisia, agenesia diafragmática
#10	46,XX	130	18	31	DW, ventriculomegalia
#11 ^{WGA}	46,XY	110	20	24	Onfalocele, acrania, agenesia renal unilateral, agenesia pulmões
#12 ^{WGA}	46,XY	114	15	24	Onfalocele
#13	46,XX	221	21	27	Onfalocele,ventriculomegalia,fenda lábio-palatina,encurtamento ossos
#14	46,XX	113	36	33	Holoprosencefalia lobar
#15	46,XY	259	14	31	Holoprosencefalia lobar
#16	46,XY	150	28	31	Holoprosencefalia semilobar
#17	46,XY	146	19	28	Ventriculomegalia
#18	46,XY	89	28	25	Ventriculomegalia, polegares em adução
#19	46,XY	414	16	32	Ventriculomegalia
#20	46,XY	111	41	29	Ventriculomegalia
#21	46,XX	47	38	22	Ventriculomegalia
#22	46,XY	116	30	27	Ventriculomegalia, AUU, polidrâmnio
#23	46,XY	130	30	22	HDC
#24	46,XX	112	21	22	HDC
#25	46,XY	515	20	28	HDC
#26	46,XY	127	28	26	Ventriculomegalia, ACC, DW,onfalocele, cardiopatia, polidactilia, genitália ambígua, cisto cordão umbilical, polidrâmnio
#27	46,XY	444	31	30	Ventriculomegalia, sequestro pulmonar
#28	46,XY	60	28	27	Holoprosencefalia alobar
#29	46,XX	52	17	25	Onfalocele,encefalocele,fenda lábio-palatina,malformação mãos e pés
#31	46,XX	211	26	27	HDC, cisto de cordão umbilical, polidrâmnio
#32	46,XX	166	35	23	HDC
#33	46,XY	100	30	22	HDC
#34	46,XX,22ps+	150	36	39	HDC
#35	46,XX	378	23	32	Cardiopatia, RCIU, oligoâmnio, alterações face, AUU, pés tortos
#36	46,XY	215	23	33	Cardiopatia, RCIU, oligoâmnio, AUU, hidropisia
#37	46,XY	509	19	30	Cardiopatia, rins multicísticos, fenda lábio-palatina, pés tortos
#38	46,XY	329	25	39	Cardiopatia
#39	46,XY	228	17	29	Cardiopatia, agenesia renal unilateral
#40	46,XY	58	25	29	Hidropisia, polidrâmnio
#41	46,XX	289	36	34	Hidropisia, polidrâmnio
#42	46,XY	163	18	31	Hidropisia
#43	46,XY	255	17	21	Hidropisia
#44	46,XX	336	34	27	Cardiopatia, dextroposição estômago, AUU
#45	46,XX	71	27	32	Cardiopatia, agenesia renal unilateral, meningocele, alterações face, ânus imperfurado, genitália ambígua, RCIU, AUU
#46	46,XY	81	35	32	Ventriculomegalia, ACC, cardiopatia, fenda lábio-palatina, microftalmia
#47	46,XX,inv(9)(p12;q21)	65	22	25	Cardiopatia
#48	46,XX,16qh+	301	29	36	Macrocrania, macrosomia, polidrâmnio, atresia esôfago (não confirmado)
#49	46,XX,9qh-	103	21	37	Ventriculomegalia, ACC, fenda lábio-palatina
#50	46,XY	105	24	29	Cardiopatia, rim multicístico unilateral, fêmur curto, critorquidia, pronação membros superiores, AUU

#30 corresponde ao caso excluído

WGA = Whole Genome Amplification. Casos submetidos a amplificação por PCR

[DNA] = Concentração de DNA na amostra, em ng/μl

Idade Gestacional = em semanas completas no momento da coleta do sangue fetal para o array CGH

HDC = Hérnia Diafragmática Congênita

WalkerDE = Displasia Esquelética

RCIU = Restrição de Crescimento Intrauterino

ACC = Agenesia de Corpo Caloso

DW = Malformação de Dandy-

AUU = Artéria Umbilical Única

8.6. Anexo 6 – Resumo das características clínicas e moleculares dos 13 casos com perdas e ganhos genômicos considerados significativos dos pontos de vista citogenético e clínico

Caso	Alteração	Tamanho estimado (Mb)	Número de clones alterados	Posição cromossômica	Alterações ultrassonográficas / Anomalias congênitas
#6	Trissomia 13		122		HDC
#12	Del 15q11.2	2.48	3	chr15:18,461,855-20,942,145	Onfalocele
	Del 9q34.3	3.12	2	chr9:136,982,786-140,100,260	
#14	Dupl 11p15.5-pter	0.08	3	chr11:189,222-267,188	Holoprosencefalia lobar
	Dupl 19q13.1-q13.2	1.34	2	chr19:44,449,022-45,790,433	
#15	Del 5q12-q13	0.65	2	chr5:69,777,035-70,423,291	Holoprosencefalia lobar
#26	Del 9p22-p24.3	13.63	7	chr9:537,217-14,171,677	Ventriculomegalia, ACC, DW, onfalocele, cardiopatia, polidactilia, genitália ambígua, cisto cordão umbilical, polidrâmnio
#35	Del 4p15.1-p16.3	24.62	33	chr4:55,641-24,680,196	Cardiopatia, RCIU, oligoâmnio, alterações face, AUU, pés tortos
#38	Del 15q11.2	1.08	3	chr15:18,461,855-19,545,305	Cardiopatia
#41	Del 14q32.33	0.23	2	chr14:106,048,091-106,278,184	Hidropisia, polidrâmnio
#42	Del 15q25.2	1.90	2	chr15:80,867,008-82,766,552	Hidropisia
#43	Del 15q11.2	0.23	2	chr15:19,316,573-19,545,305	Hidropisia
#46	Del 9p12	1.21	2	chr9:40,643,667-41,857,393	Ventriculomegalia, ACC, cardiopatia, fenda lábio-palatina, microftalmia
#48	Del 15q11.2-q13.1	4.36	14	chr15:21,523,223-25,883,695	Macrocrania, macrosomia, polidrâmnio, atresia esôfago (não confirmado)
	Del 9p13.1-q12	29.98	5	chr9:38,801,540-68,779,336	
#50	Del 15q11.2	1.08	4	chr15:18,461,855-19,545,305	Cardiopatia, rim multicístico unilateral, fêmur curto, critorquidia, pronação membros superiores, AUU

Casos #12, #14 e #48 apresentaram 2 alterações cromossômicas.

HDC = Hérnia Diafragmática Congênita

ACC = Agenesia de Corpo Caloso

DW = Malformação de Dandy-Walker

AUU = Artéria Umbilical Única

RCIU = Restrição de Crescimento Intrauterino

8.7. Anexo 7 – Classificação dos clones alterados dentro dos grupos de malformações fetais

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÊNITA							
#1		RP11-239E10	1q41-42.13	RP11-555E9	8p23.3	RP1-103M22	6p24
				RP11-257P3	8q21.2-21.3	RP11-22F2	14q23.1
#2	X						
		RP11-1197E19	4p16.3	RP1-163M9	1p35.1-36.21	RP4-628J24	1p36.33
		RP4-580L5	8p23.3	RP1-273P12	6p22.3-23	RP11-547D24	1p36.33
				RP1-128O3	6q21-22	RP11-73D11	1q32.1
				GS-908-H22	11pter	RP11-352A18	3q28
				RP11-616M22	16p13.3	RP11-10O3	4q32.2
				RP11-252A24	16q22.3	RP1-133H11	6p24
#3				RP5-59D14	17p13.3	RP11-213G6	8p21.2
				RP11-300G13	17q24.3	RP11-216L13	9q34.3
				RP3-402G11	22q13.33	CTD-2009H2	11q13.3
						RP11-303I17	15q13.3
						RP11-537K8	15q22
						RP11-62C7	18q21.33
						RP3-437O22	22q12.2~13.1
#4						RP11-79M19	10q25.3
						RP11-744L17	17q12
				RP11-18M11	10q11.21	RP3-395M20	1p
#5*						CITB-51J22	7q11.23
						RP11-304L19	16p132.3
						RP11-744L17	17q12
		Trissomia 13		RP11-348A21	7p22.2	RP11-69I22	6q12
				RP11-20L17	7q11.21	RP11-537K8	15q22
				RP11-45N18	7q11.1-11.2	RP1-141I3	22q13.1~13.33
#6				RP11-776G16	7q11.23		
				RP11-17M8	8q24.2		
				RP11-80F22	16p11.1		
				RP3-355C18	22q13.3		
#23						RP11-625N16	2p25.3
						RP11-52G4	4q34.1
						RP179O9	17q11.2-12
#24				RP11-13C13	12p13.2		
				RP11-311A12	9p23	RP11-34I24	1p21.1
#25				RP11-344A5	10q21.2-q22.1	RP11-90A15	5q23.1
						RP11-69I22	6q12
						RP11-765C10	10q23.31
				RP11-121C9	1q41	RP11-477N3	2p16.2
				RP11-140B20	2q14.3	RP11-34N13	2q33.1
				RP11-352E6	4p15.33	RP11-91M18	3p21.31
				RP11-29F10	4p15.1	RP11-5K24	4q21.21
				RP11-91M6	5p13.1	RP11-636B14	4q35.2
				RP11-184M21	8q24.22	RP11-22L21	6q16.1
				RP11-63P12	9q21.13 12q24.33	RP11-164G6	6q22.33
#31				RP11-81G12	21q21.1	RP11-957J11	7q21.11
				RP11-61A21		RP11-170D7	7q31.1
						RP11-56H7	10p12.31
						CMB9-92L10	11q14.1
						RP11-555G19	11q25
						RP11-511H9	12q23.2
						RP11-114P16	14q23.1
						RP11-79B13	14q24.1
						RP11-81L17	15q25.2
#32						RP11-63K6	6q15
						RP11-80H6	16q24.1
#33	X						
				RP11-1N7	2p25.3	RP11-90G17	5p14.1
#34				RP11-21A22	10q11.22	RP11-720L3	18p11.21
						RP11-354F21	22q11.1

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
HOLOPROSENCEFALIA							
#14				RP1-283E3	1p36.21-36.33	RP11-602P21	6p21.2
				RP1-160H23	1q44	RP11-48C7	9q34.3
				RP11-328L16	2p22-23	RP11-67A5	19q13.1~13.2
				RP3-375M21	6q14.1~15	RP11-384E6	19q13.2
				RP1-44H16	11p15.5	RP11-17I20	19q13.3
				GS-908-H22	11pter		
				RP5-908H22	11p15.5		
				RP11-598F7	12p13.33		
				RP11-277E18	12p13.2-13.3		
				RP11-256C2	14q11.2~12		
				RP11-26M6	14q13		
				RP11-173D3	15q11.2		
				CTD-2184G2	15q26.3		
				RP11-64L12	16p13.3		
			RP1-104C13	22q13.2~13.3			
#15				RP11-551B22	5q13	RP11-34I24	1p21.1~21.3
				RP11-195E2	5q12	RP11-537K8	15q22
				CTB-23I15	7q11		
				RP11-300G13	17q24.3		
#16				RP11-91G12	1q31.3	RP11-118M12	2q37.3
				RP11-625N16	2p25.3	RP11-352A18	3q28
				RP11-551B22	5q13	RP3-462C17	6p21.1
				GS-261-B16	10qter	RP11-3G21	8p22
				RP11-107O19	15q11.2	RP11-483F11	10q23.31-24
				RP11-23J11	15q14	RP11-416K5	15q21
				RP11-160E2	17p11.2	RP11-537K8	15q22
				RP1-141I3	22q13.1~13.33	RP11-46E14	17q25.3
						GS-325-I23	19qter
						RP5-860F19	20p12.3~13
						RP11-379J5	20p11.23
						RP4-745C22	22q11.22~12.3
#28				RP11-80F22	16p11.1	RP11-353K11	2q11.2
						RP5-1011O17	2q37.3
						RP11-15M20	5q14.2
						RP1-103M22	6p24
CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
VENTRICULOMEGALIA							
#17		RP11-503G7	12q24.33	GS-62-L8	1p36.33	RP3-395M20	1p
				RP11-332L18	1q41	RP11-314K4	1p13.3
				RP11-203P12	4q22-23	RP11-17O13	3q12.3
				RP1-217P22	6p21.1~21.31	RP11-21B17	3q24
				RP11-122K13	10q26.3	RP11-10O3	4q32.2
				GS-908-H22	11pter	RP11-603O17	5q35.2
				RP11-79A4	11p11.2	RP1-273P12	6p22.3-6p23
				RP11-496H24	12q11	RP4-531J23	7p21.2
				RP11-23J11	15q14	CITB-23M10	7p15.3
				GS-154-P1	15qter	RP4-665P5	7q11.23
				RP11-728H8	16p13.3	RP11-89O6	11p15.4
				RP11-81D3	16q12.2	RP11-216P6	17p13
				RP11-380H7	17p13.3	RP11-46E14	17q25.3
				RP11-160E2	17p11.2	RP11-149I9	17q25.3
				RP11-744L17	17q12	RP11-383B15	19p13.3
				RP1-99K24	22q13.33	RP11-317E13	19q13.2
						GS-325-I23	19qter
						RP3-337O18	20q12-13.1
#18				RP11-451E16	9q33		

#19			RP11-91G12	1q31.3	RP5-905H16	1p22.1-22.3
			RP11-203P12	4q22-23	RP11-353K11	2q11.2
			RP11-16E6	4q31.21	RP11-102M8	2q24.3
			RP11-10O3	4q32.2	RP11-146E16	3p13-14
			RP3-442I1	6q12-13	RP11-21B17	3q24
			RP1-304O5	6q12-13	RP11-352A18	3q28
			RP1-128O3	6q21-22	RP11-90P15	4q13.1
			RP11-45N18	7q11.1-11.2	RP11-115A14	4q25
			RP11-38P6	9p13.1	RP11-18M19	5p14.3
			RP11-314P12	10q11.22	RP1-273P12	6p22.3-23
			RP5-998N23	11p15.5	RP1-70A9	6q16.3-22.1
			RP11-496H24	12q11	RP3-451B21	6q24
			RP11-26M6	14q13	RP11-41F23	7q11.21-11.22
			RP11-23J11	15q14	RP11-3G21	8p22
			RP11-597K23	15q25.2	RP11-353E22	14q22.2
			RP11-334D3	16p13.3	RP11-81L19	16p12-p13.1
			RP11-81D3	16q12.2	RP11-787D11	16q22.3
			RP11-744L17	17q12		
			RP11-625N16	2p25		
#20			RP5-963K23	20q13		
#21			RP11-793G16	9q12	RP11-709B10	4q22.3
					RP11-89A10	6q23-24
#22					RP11-329O10	2q33
#27					RP1-126A5	1q36.21
#49*			RP5-1060K6	15q11.2		
			RP11-671M22	15q25.2		
			RP1-141I3	22q13.2		
#13*			RP5-905H16	1p22.1	RP5-879H24	1p32.2
			RP11-277E18	12p13.2	RP11-16B4	2p16.3
#26**	RP11-31F19	9p24.3			RP11-511H9	12q23
	RP11-472J6	9p24.3				
	RP11-31M2	9p24.3				
	RP11-79K3	9p23-p24.3				
	RP11-382H24	9p23				
	RP11-120J1	9p22.1-p23				
	RP11-79B9	9p22~23				
#46*	RP11-598F7	12p13.33	RP11-271E2	3p25.1	CTD-2547K4	11q13.4
			RP11-811I15	5p15.33	RP11-10E12	21q21.1
			RP11-395E19	9p12		
			RP11-45O22	9p12		
			RP11-496H24	12q11		
			RP11-815P21	14q32.33		
			RP5-1107C24	20q13.33		

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
CARDIOPATIAS							
#35	Del 4p15-pter (33 clones)			RP11-142G1	16q12.1	RP11-79E3	4p15.1
						RP11-27K15	5q21.3
						RP11-153B11	18q21.31
#36			RP11-59B13	1p13.3	RP5-885E17	1p33	
			RP11-21B17	3q24	RP11-144B4	4q22.3	
			RP11-81O13	10q21.1 11q14.1	RP11-18M19	5p14.3	
			RP11-7H7		RP3-473B4	6p12.3	
					RP11-449D3	8q24.23	
					RP11-31E13	10q22.3	
#37*			RP11-439A17	1p12	RP11-113P14	13q13.3	
			RP11-109D4	16p12.3			
#38			RP11-173D3	15q11.2			
			RP11-810K23	15q11.2			
			RP5-1060K6	15q11.2			
#39			CTB-139P11	7q11.23			
			RP11-259G18	17q21			
			RP11-354F21	22q11.1			

#47	X					
#5*	RP11-304L19	16p132.3	RP11-18M11	10q11.21	RP3-395M20 CITB-51J22 RP11-744L17	1p 7q11.23 17q12
#7*	RP11-324L3	10q24.32	GS-62-L8 RP1-160H23 RP1-128O3 GS-112-N13 CTD-2184G2 RP11-81D3 RP11-300G13	1p36.33 1q44 6q21-22 9q34.3 15q26.3 16q12.2 17q24.3	RP3-395M20 RP11-118M12 RP11-448N11 GS-44-H16 RP11-598F7 RP11-671M22 GS-50-C4	1p 2q37.3 6q11.1b 11pter 12p13.33 15p13 17qter
#8*	RP1-103M22 RP11-44D19	6p24 8q12	RP11-18I15	9q31.2	RP11-217N3 RP11-313P18	3q13.31 15q21
#45*			RP11-499D5	16p11.2		
#50*			RP11-4C12 RP11-38P6 RP11-173D3 RP11-509A17 RP11-810K23 RP5-1060K6 RP11-91M1	9p13.1 9q12 15q11.2 15q11.2 15q11.2 15q11.2 17q25.2		
#26**	RP11-31F19 RP11-472J6 RP11-31M2 RP11-79K3 RP11-382H24 RP11-120J1 RP11-79B9	9p24.3 9p24.3 9p24.3 9p23-p24.3 9p23 9p22.1-p23 9p22~23			RP11-511H9	12q23
#44**			RP11-219C24	1p26.21	CTD-2351A16	5p13.3

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES				
		ALT. DESCRITA		CNV	ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone
ONFALOCELE						
#12			RP5-915N17	1q42.11-42.3	RP1-9E21	1q24-25
			RP11-340A14	7q11.23	RP11-11G7	2q24.3
			RP4-669B10	7q35	RP11-38F19	6p12
			RP11-91A23	10p11.2	CTB-135I17	9q34.3
			RP11-183H16	12q13.3	RP11-311J21	9q34.3
			RP11-173D3	15q11.2	RP11-353E22	14q22.2
			RP11-509A17	15q11.2	RP11-274A17	16p11.2
			RP11-107O19	15q11.2	RP11-79O9	17q11.2-12
			RP11-80F22	16p11.1		
			RP11-744L17	17q12		
#5*			RP11-18M11	10q11.21	RP3-395M20	1p
					CITB-51J22	7q11.23
					RP11-304L19	16p132.3
					RP11-744L17	17q12
#11*	RP11-433M14	17p13	RP11-220O14	3p12.3b	RP11-11G7	2q24.3
			RP11-340A14	7q11.23	CITB-23M10	7p15.3
					RP11-163N6	8q12-13
#13*	RP5-905H16	1p22				
#29*	RP11-11F5	2q22.1	RP4-601K24	1p22.3-p31.2	RP1-121G13	6q16
	RP11-118M12	2q37.3	RP11-90I19	3q13.1		
#26**	RP11-31F19	9p24.3			RP11-511H9	12q23
	RP11-472J6	9p24.3				
	RP11-31M2	9p24.3				
	RP11-79K3	9p23-p24.3				
	RP11-382H24	9p23				
	RP11-120J1	9p22.1-p23				
	RP11-79B9	9p22~23				

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
MALFORMAÇÃO DE DANDY-WALKER							
#10	RP11-202O6	13q32	RP1-224A6	1p35.1~36.23	RP11-86F24	1p21	
			RP11-91J11	4q21-22 4q21.23	RP11-16A1	2q12.3	
			RP11-8N8	5p13	RP11-53F2	4p15.1-4p15.1	
			RP11-67N10	6q21-22	RP11-91C2	4q24-4q25	
			RP1-128O3	12q13.3	RP11-3C24	5p	
			RP11-183H16		RP11-47L19	5q23.1	
					RP4-676J13	6q14	
					RP11-202C2	10q24.33-25	
					RP11-626C11	10q25.1-26.1	
					CTD-2147G24	20p12.3	
#7*			GS-62-L8	1p36.33	RP3-395M20	1p	
			RP1-160H23	1q44	RP11-118M12	2q37.3	
			RP1-128O3	6q21-22	RP11-448N11	6q11.1b	
			GS-112-N13	9q34.3	RP11-324L3	10q24.32	
			CTD-2184G2	15q26.3	GS-44-H16	11pter	
			RP11-81D3	16q12.2	RP11-598F7	12p13.33	
			RP11-300G13	17q24.3	RP11-671M22	15p13	
#8*				GS-50-C4	17qter		
				RP11-181I5	9q31.2	RP11-217N3	3q13.31
						RP1-103M22	6p24
						RP11-44D19	8q12
#26**				RP11-313P18	15q21		
				RP11-511H9	12q23		
				RP11-31F19	9p24.3		
				RP11-472J6	9p24.3		
				RP11-31M2	9p24.3		
				RP11-79K3	9p23-p24.3		
				RP11-382H24	9p23		
				RP11-120J1	9p22.1-p23		
				RP11-79B9	9p22~23		

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
HIDROPISIA NÃO IMUNE							
#40				RP11-25C1	15q11	RP11-506D12	17q21
#41				RP11-12F16	14q32.33		
				RP5-820M16	14q32.33		
#42						RP11-152F13	15q25.2
						RP11-671M22	15q25.2
						RP11-104N14	18q21

CASO	S/ ALT.	ALTERAÇÕES					
		ALT. DESCRITA		CNV		ALT. NÃO DESCRITA	
		Clone	Região	Clone	Região	Clone	Região
POLIMALFORMADOS							
#5	RP11-304L19	16p132.3	RP11-18M11	10q11.21	RP3-395M20	1p	
					CITB-51J22	7q11.23	
					RP11-744L17	17q12	
#7	RP11-324L3	10q24.32	GS-62-L8	1p36.33	RP3-395M20	1p	
			RP1-160H23	1q44	RP11-118M12	2q37.3	
			RP1-128O3	6q21-22	RP11-448N11	6q11.1b	
			GS-112-N13	9q34.3	GS-44-H16	11pter	
			CTD-2184G2	15q26.3	RP11-598F7	12p13.33	
			RP11-81D3	16q12.2	RP11-671M22	15p13	
			RP11-300G13	17q24.3	GS-50-C4	17qter	
#8	RP11-103M22 RP11-44D19	6p24 8q12	RP11-181I5	9q31.2	RP11-217N3	3q13.31	
					RP11-313P18	15q21	
#11	RP11-433M14	17p13	RP11-220O14	3p12.3b	RP11-11G7	2q24.3	
			RP11-340A14	7q11.23	CITB-23M10	7p15.3	
					RP11-163N6	8q12-13	
#13							

#29	<i>RP11-11F5</i>	<i>2q22.1</i>	<i>RP4-601K24</i>	<i>1p22.3-p31.2</i>	<i>RP1-121G13</i>	<i>6q16</i>
	<i>RP11-118M12</i>	<i>2q37.3</i>	<i>RP11-90I19</i>	<i>3q13.1</i>		
#35	<i>Del 4p15-pter</i> (33 clones)		<i>RP11-142G1</i>	<i>16q12.1</i>	<i>RP11-79E3</i>	<i>4p15.1</i>
					<i>RP11-27K15</i>	<i>5q21.3</i>
					<i>RP11-153B11</i>	<i>18q21.31</i>
#37			<i>RP11-439A17</i>	<i>1p12</i>	<i>RP11-113P14</i>	<i>13q13.3</i>
			<i>RP11-109D4</i>	<i>16p12.3</i>		
#45			<i>RP11-499D5</i>	<i>16p11.2</i>		
	<i>RP11-598F7</i>	<i>12p13.33</i>	<i>RP11-271E2</i>	<i>3p25.1</i>	<i>CTD-2547K4</i>	<i>11q13.4</i>
			<i>RP11-811I15</i>	<i>5p15.33</i>	<i>RP11-10E12</i>	<i>21q21.1</i>
#46			<i>RP11-395E19</i>	<i>9p12</i>		
			<i>RP11-45O22</i>	<i>9p12</i>		
			<i>RP11-496H24</i>	<i>12q11</i>		
			<i>RP11-815P21</i>	<i>14q32.33</i>		
			<i>RP5-1107C24</i>	<i>20q13.33</i>		
			<i>RP11-690C23</i>	<i>1q44</i>		
			<i>RG-172-I13</i>	<i>2q37.3</i>		
			<i>RP11-4C12</i>	<i>9p13.1</i>		
			<i>RP11-15E1</i>	<i>9p11.2</i>		
			<i>RP11-344G16</i>	<i>9p11.2</i>		
			<i>RP11-38P6</i>	<i>9q12</i>		
#48	<i>Del 15q11.2-q13.1</i> (14 clones)		<i>RP11-793G16</i>	<i>9q12</i>		
			<i>RP11-810H22</i>	<i>15q11.2</i>		
			<i>RP11-350A1</i>	<i>15q11.2</i>		
			<i>RP11-385H1</i>	<i>15q11.2</i>		
			<i>RP11-441B20</i>	<i>15q11.2</i>		
			<i>RP11-607F22</i>	<i>15q12</i>		
			<i>RP11-339C21</i>	<i>15q12</i>		
			<i>RP11-595N10</i>	<i>15q12</i>		
			<i>RP5-1060K6</i>	<i>15q11.2</i>		
#49			<i>RP11-671M22</i>	<i>15q25.2</i>		
			<i>RP1-141I3</i>	<i>22q13.2</i>		
#50	<i>Del 15q11.2 (4 clones)</i>					
	<i>RP11-31F19</i>	<i>9p24.3</i>			<i>RP11-511H9</i>	<i>12q23</i>
	<i>RP11-472J6</i>	<i>9p24.3</i>				
	<i>RP11-31M2</i>	<i>9p24.3</i>				
#26**	<i>RP11-79K3</i>	<i>9p23-p24.3</i>				
	<i>RP11-382H24</i>	<i>9p23</i>				
	<i>RP11-120J1</i>	<i>9p22.1-p23</i>				
	<i>RP11-79B9</i>	<i>9p22~23</i>				

Clones e regiões em *itálico*: deleções

Clones e regiões em formatação normal: duplicações

Clones e regiões sublinhados: alterações com significado incerto