Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro

Estudo de doentes com suspeita clínica de síndrome de microdeleção/microduplicação pela técnica de MLPA: Aplicação do painel P297 (MRC-Holland)

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Ana Marta Cunha Rosas

Orientadora: Mestre Cristina Isabel Fernandes Candeias

Co-Orientadora: Professora Doutora Raquel Maria Garcia Chaves

Vila Real, 2018

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Estudo de doentes com suspeita clínica de síndrome de microdeleção/microduplicação pela técnica de MLPA: Aplicação do painel P297 (MRC-Holland)

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Ana Marta Cunha Rosas

Orientadora: Mestre Cristina Candeias

Co-Orientadora: Prof. Doutora Raquel Chaves

Composição do Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio

Primeiro Vogal (Arguente): Prof. Doutora Maria Filomena Lopes Adega

Segundo Vogal (Arguente): Prof. Doutora Maria do Rosário Alves Anjos

Terceiro Vogal (Co-Orientador): Prof. Doutora Raquel Maria Garcia Chaves

Vila Real, 2018

Declaração de Responsabilidade Pessoal

Eu, Ana Marta Cunha Rosas, declaro que esta Dissertação de Mestrado intitulada "Estudo de doentes com suspeita clínica de síndrome de microdeleção/microduplicação pela técnica de MLPA: Aplicação do painel P297 (MRC-Holland)" está de acordo com todas as normas éticas, técnicas e científicas exigidas. Toda a bibliografia consultada encontra-se referenciada e quando citada no texto está claramente identificada. A Dissertação de Mestrado não contém algum tipo de plágio e, caso apresente indicações que se caracterizem como tal, estou ciente das implicações legais consequentes.

Faz parte integrante desta dissertação as seguinte scomunicação em Poster:

- **Título: Microdeletion Syndrome Study of a patient cohort using one MLPA® Panel.**

  Autores: Marta Rosas, Cristina Candeias, Raquel Chaves, Manuela Mota Freitas, Natália Oliva Teles, Maria da Luz Fonseca e Silva. Poster apresentado nas XLVI Conferências de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães-CHP, em Fevereiro de 2017.

- **Título: Study of a patient cohort with suspected microdeletion/microduplication syndrome using two MLPA® Panels.**

  Autores: Marta Rosas, Cristina Candeias, Raquel Chaves, Manuela Mota Freitas, Natália Oliva Teles. Poster apresentado na 21ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana, em Novembro de 2017.

Faz parte integrante desta dissertação a seguinte Palestra a convite:

- **Título: Estudo de doentes com suspeita clínica de síndrome de microdeleção/microduplicação pela técnica de MLPA® – Aplicação do painel P297 (MRC-Holland).**

  Palestra a contive nas Reuniões Científicas UMIB/ICBAS, UP no Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães-CHP, em Junho de 2017.

Agradecimentos

Quero agradecer à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, representada pelo **Professor Doutor António Augusto Fontainhas Fernandes**, Reitor da UTAD.

À **Drª Maria da Luz Fonseca e Silva**, por mais uma vez me dar a oportunidade de realizar o meu trabalho no laboratório de Citogenética do CGMJM-CHP, por todo o apoio e disponibilidade que demonstrou e por todo o conhecimento transmitido.

À **Drª Natália Oliva Teles** por tudo o que me ensinou, por todos os conselhos e por se ter mostrado sempre disponível para me ajudar.

À minha orientadora, **Drª Cristina Candeias**, agradeço em primeiro lugar ter aceitado mais uma vez orientar-me e acompanhar-me em mais uma etapa importante. Obrigada por tudo aquilo que me ensinou em todo o tempo que aí estive, aprendi muito consigo. Obrigada por todas as vezes que insistiu comigo para melhorar, todas as vezes que me mostrou que eu consigo fazer mais e melhor, fez-me crescer. Obrigada por todo o tempo que dispensou para me ajudar, pelo apoio e disponibilidade que sempre teve comigo. Obrigada por toda a simpatia, por todos os conselhos, por todos os momentos de diversão, por sempre me ter tratado como uma "filha".

À minha co-orientadora, **Professora Raquel Chaves**, agradeço o esforço que fez para que eu pudesse realizar o meu trabalho no CGMJM-CHP. Obrigada por toda a disponibilidade e apoio que sempre demonstrou e pela simpatia com que sempre me tratou.

À Unidade de Citogenética do CGMJM-CHP, a todas sem exceção, agradeço toda a hospitalidade, o apoio, a disponibilidade e a simpatia. Obrigada por me fazerem sentir "em casa", por sempre me tratarem tão bem. Obrigada por todos os momentos de apoio e transmissão de conhecimentos, bem como por todos os momentos de "risota" e conversa.

À **Drª Rosário Santos** por me ter autorizado e disponibilizado o uso do laboratório de Genética molecular para a realização de parte do meu trabalho. À Unidade de Genética Molecular do CGMJM-CHP, agradeço a todos por sempre me terem ajudado, por sempre se mostrarem disponíveis, por tudo o que me ensinaram por me terem recebido tão bem.

Ao **Nuno**, obrigada por tudo! Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, por sempre estares disponível para ajudar e dar conselhos, por todo o apoio. Obrigada por todas as horas de almoço e momentos de boa disposição que passamos juntos.

À **Mónica**, obrigada pelo apoio que sempre demonstraste, obrigada por todos os conselhos e por todas as conversas. Obrigada por todos os momentos de diversão e boa disposição! Ao **Luís**, por todo o apoio e amizade ao longo deste percurso! Ao **Sebastião**, à **Bárbara** e à **Lisandra** obrigada por todas as conversas e momentos de diversão que partilhamos e, acima de tudo, obrigada pelo vosso apoio!

À "segurança de nós todos", **Cláudia**. Agradeço toda a simpatia que sempre teve comigo, todas as conversas que tivemos e todos os conselhos que me deu. Obrigada por todos os momentos de boa disposição e pelo seu carinho!

À minha **Sara**, um grande apoio nestes seis anos, para ti todos os agradecimentos parecem poucos, por isso apenas agradeço continuares a "aturar-me", és a melhor! À **Diana**, à **Joana** e à **Vânia** obrigada pelo vosso apoio incondicional e pela vossa grande amizade! À minha **Caty**, "a mais engraçada", por sempre me fazer rir, por todos os momentos partilhados nestes dois anos e por todo o apoio, muito obrigada por tudo! Ao **Rui**, obrigada por todo o apoio, todas as conversas e por todos os momentos que passamos na "Bila"! Às meninas de Biologia da FCUP, obrigada pela vossa preocupação e apoio!

Aos meus "amigos do Milk", por toda a preocupação e apoio, em especial ao **Rui S.**, ao **Gabriel** e à **Sara V.**, por todo o vosso apoio e conselhos, pelos momentos que passamos, por estarem presentes ao longo deste percurso. Ao **Carlos**, porque apesar de não estares presente desde o início deste percurso, seres muito importante para mim. Obrigada por todas as conversas, todos os desabafos e momentos de nervosismo que "aturaste", por me teres sempre dado força para acreditar que era capaz, obrigada por tudo!

Aos meus familiares, obrigada pelo vosso apoio incondicional, pelos vossos conselhos e pela força que me deram! À minha prima **Lia**, que esteve presente desde o início, obrigada por me acompanhares e me ajudares em tudo, por todos os conselhos que me deste, foste essencial para mim durante todo este percurso académico e durante toda a minha vida!

À minha irmã, **Nocas**, porque apesar de nos "pegarmos" várias vezes, sem ti não era a mesma coisa e a ti devo muito. Obrigada pelo teu companheirismo, por me tentares sempre acalmar e dar força, por me apoiares sempre. Obrigada por seres, para além de uma irmã, uma grande amiga!

Por fim, às pessoas mais importantes, àqueles a quem devo tudo, os meus pais, **Pedro** e **Fátima**. Muito obrigada por me terem dado a oportunidade de chegar até aqui, por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse seguir aquilo que queria, por me terem

apoiado sempre, por me terem dado conselhos e sermões para que eu pudesse aprender e crescer, por acreditarem em mim! Sem vocês não teria chegado até aqui, é a vocês que devo e dedico tudo o que fiz!

Resumo

As microdeleções e as microduplicações têm geralmente 1 a 2 Mb de tamanho e estão normalmente relacionadas, associadas a síndromes genéticos. Estes síndromes estão frequentemente associados a défice intelectual, atrasos no desenvolvimento, múltiplas anomalias congénitas, perturbações do espetro autista, entre diversos achados fenotípicos. A técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA, MRC-Holland, Netherlands) é um método eficaz de rastreio de microdeleções/microduplicações. Recentemente ficou comercialmente disponível um novo painel de MLPA, com sondas para regiões que foram nos últimos anos associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação, o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2* (painel P297).

Neste estudo foram analisadas com o painel P297 99 amostras, das quais 96 eram de pacientes que já tinham efectuado cariótipo e sido rastreados pelo painel *SALSA® MLPA® Probemix P245* (painel P245) e cujos resultados foram normais, permanecendo assim sem diagnóstico. Destas 96 amostras sem diagnóstico, 89 apresentaram um número de cópias normais para as regiões estudadas e sete amostras apresentaram alterações no número de cópias. Três amostras analisadas eram de pacientes já com diagnóstico efectuado, com o objectivo de o confirmar e/ou complementar. Dois casos (1 e 2) apresentaram uma alteração na banda 1q21.1 (duplicação e deleção, respetivamente); os Casos 3, 4 e 5 apresentaram uma alteração na banda 3q29 (deleção, duplicação e deleção, respetivamente); os Casos 6, 7, 8 e 9 apresentaram uma alteração na banda 15q13.3 (deleção em todos) e o Caso 10 apresentou uma alteração na banda 18q21.2. Para cinco casos (2, 3, 4, 6 e 7) foi possível estudar a origem da alteração, sendo que em quatro casos são herdados e num caso é *de novo*.

Com este trabalho foi possível demonstrar a importância do uso conjunto do painel P245 e do painel P297 para um rastreio mais completo dos síndromes de microdeleção/microduplicação nos doentes estudados, apresentando-se como um recurso útil e económico a disponibilizar no laboratório de Citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães – Centro Hospitalar do Porto, EPE.

Palavras chave: Microdeleções; Microduplicações; Síndrome; Citogenética molecular; MLPA; P297.

Abstract

Chromosomal microdeletions and microduplications are typically 1 to 2 Mb long and are usually associated with genetic syndromes. They have been proven to cause multisystemic pathologies frequently associated with intellectual disability, developmental delay, multiple congenital anomalies, autistic spectrum disorders and diverse phenotypic findings. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA, MRC-Holland, The Netherlands) is a good screening method for chromosomal microdeletions and microduplications. A new MLPA microdeletion panel for laboratory use, aiming to test patients for several new microdeletion syndromes, SALSA® MLPA® probemix P297 Microdeletion syndromes-2 (P297), is recently commertialy available.

In this study 99 samples were tested using the P297 panel, 96 of these samples had been previously analysed both for chromosomal studies and SALSA® MLPA® Probemix P245 (P245) and all their respective results were normal. From these 96 samples, 89 were normal and seven revealed a copy number alteration. Three of the analyzed samples, that were already diagnosed, were performed to confirm and/or complement the diagnosis. Two cases (1 and 2) showed an alteration in copy number in the band 1q21.1 (duplication and deletion, respectively); Cases 3, 4 and 5 showed an alteration in copy number in band 3q29 (deletion, duplication and deletion, respectively); Cases 6, 7, 8 and 9 showed an alteration in copy number in band 15q13.3; Case 10 showed an alteration in copy number in band 18q21.2. For five cases (2, 3, 4, 6 and 7) it was possible to study the origin of the alteration; four cases have been inherited and one case was *de novo*.

With this work we demonstrate the importance of the combined use of MLPA panels P245 and P297 for more complete investigation of microdeletion/microduplication syndrome associated regions, which is a very useful and economical resource to be available in the Cytogenetics Unit of the Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães – Centro Hospitalar do Porto, EPE.

Key words: Microdeletions; Microduplications; Syndrome; Molecular Cytogenetics; MLPA; P297.

Índice

Página

Declaração de Responsabilidade Pessoal……..…...iv

Agradecimentos…….vii

Resumo…….xi

Abstract…….……xiii

Índice de Figuras……...……..……...xvii

Índice de Tabelas…….xxi

Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos……..….xxiii

1. Introdução……...1

1.1. Cromossoma: morfologia, estrutura e função……1

1.2. Alterações cromossómicas……3

1.2.1. Alterações cromossómicas numéricas……3

1.2.2. Alterações cromossómicas estruturais……4

1.2.2.1. Deleções……...5

1.2.2.2. Duplicações……..5

1.2.2.3. Inversões……..6

1.2.2.4. Cromossoma em anel……7

1.2.2.5. Translocações……7

1.2.2.6. Isocromossoma……...8

1.3. Microdeleções e Microduplicações……10

1.4. Citogenética convencional……...12

1.5. Citogenética molecular……14

1.6. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification……....15

1.6.1. SALSA® MLPA® P245 Microdeletion syndromes-1 probemix……...……..20

1.6.2. SALSA® MLPA® P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix……21

1.6.2.1. Banda 1q21.1……23

1.6.2.2. Banda 3q29……25

1.6.2.3. Banda 7q36.1……...……26

1.6.2.4. Banda 12p11.23……27

1.6.2.5. Região 15q13……28

1.6.2.6. Região 15q24……..….29
1.6.2.7. Região 16p11.2/16p12.2……30
1.6.2.8. Banda 17q12……31
1.6.2.9. Banda 18q21.2……..32
1.6.2.10. Banda 20p12.2……..33
2. Objetivos……..35
3. Materiais e Métodos……..37
3.1. Amostras Biológicas……37
3.2. Extração de DNA……..38
3.3. Quantificação e avaliação da qualidade de DNA……..…….39
3.4. Aplicação da técnica de MLPA……...39
3.5. Separação de fragmentos por Eletroforese Capilar……40
3.6. Análise dos resultados……41
4. Resultados……43
4.1. Banda 1q21.1……45
4.2. Banda 3q29……48
4.3. Região 15q13……51
4.4. Banda 18q21.2...……..53
4.5. Estudo dos progenitores……..54
4.6. Avaliação do uso do *SALSA® MLPA® P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix*..57
5. Discussão de Resultados……59
5.1. Banda 1q21.1……59
5.2. Banda 3q29……60
5.3. Região 15q13……62
5.4. Banda 18q21.2……..63
5.5. Estudo dos progenitores……..64
5.6. Avaliação do uso do *SALSA® MLPA® P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix*..65
6. Conclusão……67
7. Referências Bibliográficas……..69

Índice de Figuras

Figura 1 – Cariograma com uma alteração cromossómica numérica, neste caso estando presente uma trissomia 21……..….**4**

Figura 2 – Imagem ilustrativa de uma deleção terminal e intersticial.....**5**

Figura 3 - Imagem ilustrativa de uma duplicação……...**6**

Figura 4 – Imagem ilustrativa de uma inversão paracêntrica e pericêntrica……..**6**

Figura 5 – Imagem ilustrativa de um cromossoma em anel…….**7**

Figura 6 – Imagem ilustrativa de uma translocação recíproca e de uma translocação robertsoniana…….**8**

Figura 7 – Imagem ilustrativa de um isocromossoma……**9**

Figura 8 – Representação esquemática do mecanismo recombinação homóloga não-alélica (NAHR)……..**11**

Figura 9 –Metafase de células de sangue periférico humano com bandas G, observada ao microscópio……...**13**

Figura 10 - Principais passos da reação de MLPA……**17**

Figura 11 - Sondas presentes no painel P297 ordenadas de acordo com a localização cromossómica……...**21**

Figura 12 – Representação esquemática da localização cromossómica da banda 1q21.1, relativa à região proximal……..……..**24**

Figura 13 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 1q21.1, relativa à região distal……..**24**

Figura 14 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 3q29, associada ao síndrome de microdeleção/microduplicação 3q29……..…**25**

Figura 15 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 7q36.1...**26**

Figura 16 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 12p11.23……**27**

Figura 17 - Representação esquemática da localização cromossómica da região 15q13...**28**

Figura 18 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 15q24.1…….**29**

Figura 19 - Representação esquemática da localização cromossómica das regiões 16p11.2, 16p12.1 e 16p12.2…….**30**

Figura 20 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 17q12……...**31**

Figura 21- Representação esquemática da localização cromossómica da banda 18q21.2……**32**

Figura 22 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 20p12.2……..…**33**

Figura 23 - *Workflow* de selecção das amostras e da metodologia utilizada no trabalho…..**37**

Figura 24 – Principais etapas do processo de extração de DNA como *biorobot Qiagen EZ1*® *Advanced*…….**38**

Figura 25 - Eletroferograma de uma amostra analisada com o painel P297……...**41**

Figura 26 - Resultado do Caso 1 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**46**

Figura 27 - Resultado do Caso 2 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®…….…….**47**

Figura 28 - Resultado do Caso 3 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**48**

Figura 29 - Resultado do Caso 4 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**49**

Figura 30 - Resultado do Caso 5 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**50**

Figura 31 - Resultado do Caso 7 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**52**

Figura 32 - Resultado do Caso 10 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**53**

Figura 33 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 2 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**55**

Figura 34 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 3 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**55**

Figura 35 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 6 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**56**

Figura 36 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 7 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®……..**56**

Figura 37 – Gráfico representativo da percentagem de amostras sem diagnóstico que obtiveram resultados com o painel P297 e a percentagem de amostras que permaneceram sem diagnóstico…….**57**

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Regiões alvo comuns do painel P297 e do painel P245……...**22**

Tabela 2 - Informações dos 10 casos que apresentaram uma alteração no número de cópias no estudo pela técnica de MLPA, usando o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297*…….**44**

Tabela 3 – Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 1……..**45**

Tabela 4 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 2…….……**46**

Tabela 5 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 3……**48**

Tabela 6 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 4…….**49**

Tabela 7 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 5……**50**

Tabela 8 - Tabela esquemática dos resultados obtidos nos Casos 6, 7, 8 e 9……**51**

Tabela 9 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 10……..**53**

Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos

‘’	Segundos
ºC	Graus centígrados
µL	Microlitros
A	Adenina
AC	Alterações comportamentais
aCGH	*array Comparative Genomic Hybridization*
ADPM	Atraso no desenvolvimentopsicomotor
bp	Pares de base (*base pairs* – bps)
C	Citosina
CNV	*Copy Number Variants*
DA	Dificuldades de aprendizagem
DC	Défice cognitivo
del	Deleção
dH_2O	Água destilada
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
dup	Duplicação
F	Feminino
Fam	Familiar
FISH	*Fluorescent in situ Hybridization*
G	Guanina
Inesp.	Inespecíficas
kb	Kilobases

LCR	*Low-copy repeats*
M	Masculino
Mat	Materno
Mb	Mega pares de base
min	Minutos
ml	Mililitros
MLPA	*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
mRNA	RNA mensageiro
MS-MLPA	*Methylation-specific - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
NAHR	*Non-allelic Homologous Recombination* (recombinação homóloga não-alélica)
ng	Nanogramas
nm	Nanómetros
P245	*SALSA® MLPA® PROBEMIX P245-B1 Microdeletion Syndromes-1*
P297	*SALSA® MLPA® PROBEMIX P297-C1 Microdeletion Syndromes-2*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
PDI	Perturbações do Desenvolvimento Inteletual
RNA	*Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RT-MLPA	*Reverse Transcription – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
SNPs	*Single Nucleotide Polymorphisms*
SPH	Síndrome de Pitt-Hopkins

T	Timina
TAR	Trombocitopenia e Ausência de Rádio

1. Introdução

1.1. Cromossoma: morfologia, estrutura e função

Os cromossomas têm uma aparência linear, quando em metafase, sendo constituídos por dois braços contínuos ao centrómero, sendo que o braço mais pequeno é designado p e o maior por q. Estes podem ser metacêntricos (o centrómero localiza-se no meio e os dois braços tem praticamente o mesmo tamanho), submetacêntricos (o centrómero localiza-se aproximadamente, um pouco deslocado da região mediana e um dos braços é um pouco maior que o outro) ou acrocêntricos (quase não existe braço curto).

A espécie humana apresenta 46 cromossomas que se organizam em 23 pares, 22 pares de autossomas (cromossomas 1 a 22) e um par de cromossomas sexuais ou heterocromossomas (X e Y). Nos autossomas cada homólogo tem igual morfologia em ambos os sexos; já a constituição cromossómica sexual difere, a mulher tem um par de cromossomas X e o homem tem um cromossoma X e um Y. Um cromossoma de cada par tem normalmente, origem materna e outro de origem paterna. O conjunto único de homólogos (um cromossoma de cada autossoma e o cromossoma sexual) é o conjunto haploide. O número haploide (n) é 23 e esta constituição apenas existe nos gâmetas (oócito e espermatozóide) (Gardner et al., 2011). Em condições normais, todas as outras células do corpo, células somáticas, têm um conjunto duplo, constituição diploide (2n) com 46 cromossomas.

Antes da evolução das técnicas de bandagem, os cromossomas eram corados e ordenados em 7 grupos (A-G) baseados no seu tamanho (do maior para o mais pequeno), na razão entre o tamanho dos braços e na localização do centrómero (Shaffer *et al.*, 2013). Os grupos organizam-se como:

- Grupo A (1-3): grandes e metacêntricos;
- Grupo B (4-5): grandes e sub-metacêntricos;
- Grupo C (6-12 e X): médios e metacêntricos/ sub-metacêntricos;
- Grupo D (13-15): médios, acrocêntricos e com satélites;
- Grupo E (16-18): relativamente pequenos e metacêntricos/ submetacêntricos;
- Grupo F (19-20): pequenos e metacêntricos;
- Grupo G (21-22, Y): pequenos, acrocêntricos e com satélites (Y não tem satélites).

Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas de bandagem, os cromossomas são distinguidos com base no seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas. Os cromossomas apresentam uma série contínua de bandas escuras e claras. Banda é definida como a parte do cromossoma que é claramente distinguível dos seus segmentos adjacentes por aparecer mais clara ou escura, com uma ou mais técnica de bandas e reflectem, de forma geral, a organização funcional do genoma que regula a replicação, reparação, transcrição e recombinação genética do DNA (Shaffer *et al.*, 2013). Dependendo da técnica usada, as bandas aparentemente escuras numa técnica podem ser claras usando outros métodos de bandagem. As bandas G positivas (bandas G escuras, bandas R claras) são ricas em Adenina e Timina e pobres em genes, enquanto que as bandas G negativas (bandas G claras, bandas R escuras) são ricas em Guanina e Citosina e em genes (Shaffer *et al.*, 2013).

As bandas e regiões cromossómicas são numeradas a partir do centrómero para as extremidades. A base molecular das técnicas de bandas envolve a composição das bases nucleotídicas, proteínas associadas e organização funcional do genoma.

Os dois componentes químicos da cromatina são DNA e proteínas. As proteínas mantêm a integridade dos cromossomas e dividem-se em histonas e não histonas. As histonas são proteínas associadas ao DNA e fortemente conservadas. A cromatina existe em diferentes estados de condensação: eucromatina e heterocromatina. A eucromatina é menos condensada e contém normalmente o DNA codificante (genes), enquanto que a heterocromatina é mais condensada e compreende o DNA não codificante (Gardner et al., 2011). As estruturas terminais dos cromossomas são os telómeros, que são sequências de DNA com muitas repetições da sequência genómica TTAGGG, que previnem a fusão com a cromatina de outros cromossomas (Gardner et al., 2011). O centrómero é uma região importante nas divisões celulares, sendo o local pelo qual o cromossoma se liga ao fuso acromático permitindo a migração das cromátides para os pólos opostos da célula em divisão e responsável pela ligação entre cromossomas homólogos na meiose.

1.2. Alterações cromossómicas

As alterações cromossómicas são alterações dos cromossomas a nível numérico e/ou estrutural. Podem ser herdadas dos pais ou ocorrerem pela primeira vez no indivíduo, denominando-se *de novo*. Estas alterações ocorrem quando há um erro nas divisões celulares (meiose ou mitose). Quando um oócito ou espermatozóide com uma alteraçãos se funde com um gâmeta normal durante a conceção, dá origem a um embrião com uma alteração cromossómica presente desde a conceção e que envolve todas as linhas celulares. No entanto, estas alterações podem ocorrer depois da conceção devido a uma divisão mitótica incorreta no zigoto, dando origem a uma linha celular com uma componente cromossómica diferente, resultando num mosaico (Gardner et al., 2011). Quando há um desequilíbrio no material genético ocorrem alterações no padrão normal de desenvolvimento, que podem levar a um abortamento espontâneo, ou, caso isto não aconteça e o feto sobreviva, a um vasto leque de alterações fenotípicas com vários graus de gravidade, tanto a nível mental como físico.

1.2.1. Alterações cromossómicas numéricas

Nas alterações numéricas ocorre uma variação no número normal de cromossomas. Podem ter diferentes consequências, dependendo se é um autossoma ou um heterocromossoma, do cromossoma envolvido e se há diminuição ou aumento no número. As alterações numéricas podem ser de dois tipos: aneuploidias e euploidias.

Uma aneuploidia consiste na perda ou ganho de um ou mais cromossomas, não incluindo um conjunto completo de cromossomas, sendo as alterações citogenéticas mais comuns (Regateiro, 2007). Exemplos de aneuploidias são as trissomias (2n+1) e as monossomias (2n-1). Nas trissomias temos como exemplo mais comum a trissomia 21 ou síndrome de Down (Figura 1), as monossomias são consideradas letais, exceptuando os casos de monossomia X ou síndrome de Turner e os casos de algumas monossomias em mosaico (Schinzel, 2001; Teixeira e Carreira, 2005)

Uma euploidia baseia-se na alteração no número de um conjunto completo haploide de cromossomas, sendo de referir como exemplos as poliploidias (3n;4n…). Geralmente, zigotos portadores de uma euploidia não sobrevivem, sendo abortados espontaneamente.

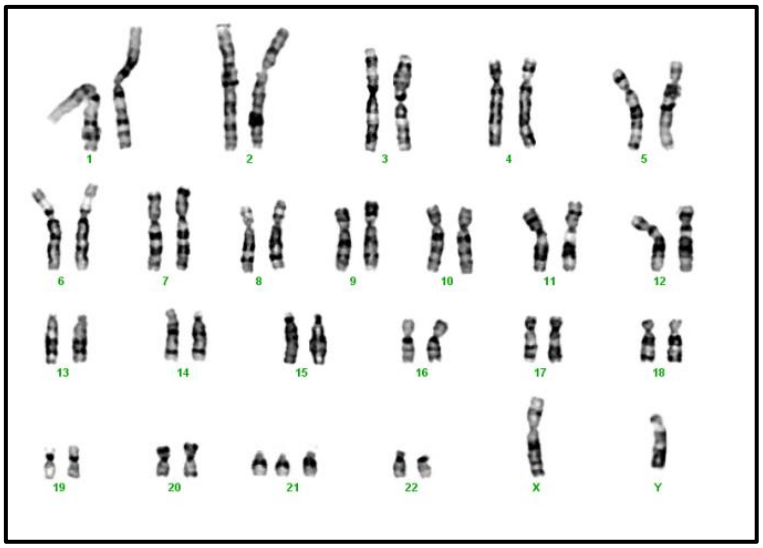


Figura 1 – Cariograma com uma alteração cromossómica numérica, neste caso estando presente uma trissomia 21, onde estão presentes três cópias do cromossoma 21 (47,XY,+21) (imagem cedida pelo laboratório de Citogenética do CGMJM-CHP).

1.2.2. Alterações cromossómicas estruturais

As alterações estruturais resultam de pelo menos uma quebra num dos braços do cromossoma e podem modificar a expressão de genes no segmento cromossómico alterado, resultando em consequências para o indivíduo. Existem várias alterações estruturais, como deleções, duplicações, inversões, cromossomas em anel, translocações e isocromossomas. Estas alterações, ao contrário das alterações numéricas que são sempre desequilibradas, podem ser equilibradas ou desequilibradas (Keagle, 2006). Nos rearranjos estruturais equilibrados toda a informação genética está normalmente presente, apenas se organiza de forma diferente no conjunto de cromossomas (por exemplo nas translocações e nas inversões). Já os rearranjos estruturais desequilibrados estão geralmente associados à presença de mais ou menos informação genética (por exemplo deleções, duplicações, isocromossomas e cromossomas em anel).

1.2.2.1. Deleções

As deleções são alterações em que parte do cromossoma é perdida, podendo ocorrer depois de uma quebra numa das extremidades do cromossoma, denominando-se terminal (Figura 2a), ou depois de duas quebras no interior do cromossoma, denominando-se intersticial (Figura 2b) (Regateiro, 2007). As consequências fenotípicas podem variar consoante tamanho do segmento perdido e do número e função das sequências envolvidas na perda (Teixeira e Carreira, 2005). Deleções inferiores a 3 Mb de tamanho são denominadas microdeleções.

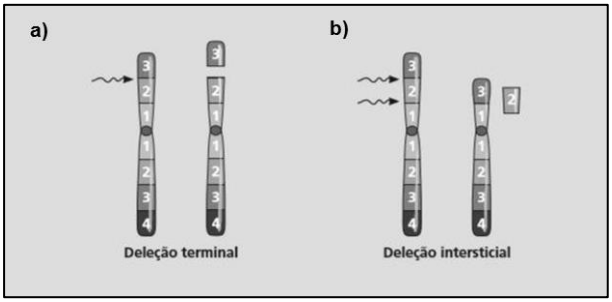


Figura 2 – Imagem ilustrativa de uma deleção terminal e intersticial. **a)** A deleção terminal ocorre numa das extremidades e resulta de um ponto de quebra; **b)** uma deleção intersticial resulta de duas quebras no interior do cromossoma [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.2.2.2. Duplicações

As duplicações (Figura 3) são alterações em que parte do cromossoma é duplicada, resultando em material genético extra. Estas podem ser diretas ou invertidas, consoante a orientação da região duplicada. Tal como nas deleções, as consequências fenotípicas dependem da extensão do material ganho, sendo geralmente menos graves que nas deleções (Regateiro, 2007). Consideram-se microduplicações quando o tamanho do fragmento duplicado é inferior a 3 Mb.

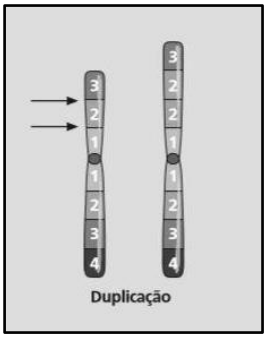


Figura 3 - Imagem ilustrativa de uma duplicação. A região cromossómica envolvida na duplicação vai estar presente num número de cópias extra [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.2.2.3. Inversões

As inversões são alterações cromossómicas resultantes da interrupção génica do cromossoma por duas quebras, seguida da reintrodução nesse cromossoma, do segmento que se encontra entre elas, com rotação de 180º. Designam-se por paracêntricas (Figura 4a), se envolverem um único braço do cromossoma e não envolverem o centrómero, ou pericêntricas (Figura 4b), se envolverem os dois braços do cromossoma e, consequentemente, o centrómero, sendo estas últimas mais frequentes (Regateiro, 2007).

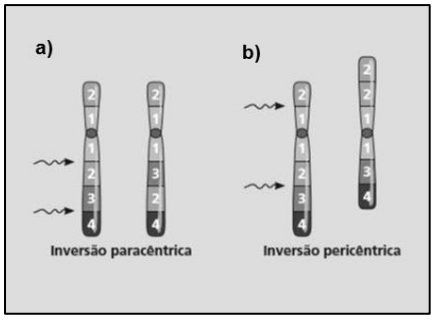


Figura 4 – Imagem ilustrativa de uma inversão paracêntrica e pericêntrica. a) Na inversão paracêntrica o centrómero não está envolvido no rearranjo; **b)** na inversão pericêntrica o centrómero está envolvido no rearranjo [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.2.2.4. Cromossoma em anel

O cromossoma em anel (Figura 5) forma-se depois de duas quebras que ocorrem nas extremidades do cromossoma e consequente fusão das extremidades, formando assim um anel e havendo perda de material genético. São acontecimentos raros, estando normalmente associados a alterações no fenótipo (Teixeira e Carreira, 2005).

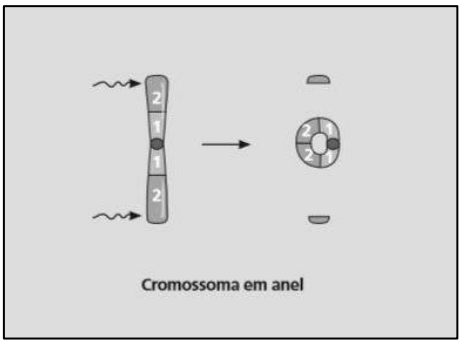


Figura 5 – Imagem ilustrativa de um cromossoma em anel. Este tipo de alteração surge depois de quebras nas extremidades do cromossoma e posterior fusão destas, formando um anel [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.2.2.5. Translocações

Nas translocações uma parte do cromossoma é transferida para outro cromossoma. O cromossoma com este rearranjo é um derivativo, sendo classificado de acordo com o centrómero. As translocações podem ser recíprocas ou não recíprocas e robertsonianas. Numa translocação recíproca (Figura 6a) há uma troca de porções entre cromossomas não homólogos, não havendo alteração no número total de cromossomas e podendo esta ocorrer em qualquer cromossoma, já uma translocação recíproca ocorre entre cromossomas homólogos. Normalmente, translocações recíprocas não apresentam alterações fenotípicas no indivíduo portador, mas os portadores podem originar gâmetas com um desequilíbrio no conteúdo cromossómico, causando alterações fenotípicas nos descendentes (Regateiro, 2007).

Numa translocação robertsoniana (Figura 6b) há uma quebra no centrómero ou próximo deste seguido de uma fusão dos braços longos dos dois cromossomas no local da quebra, ocorrendo só entre cromossomas acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22). Tal como numa translocação recíproca, o portador apresenta-se fenotipicamente normal, havendo o

risco de produção de gâmetas desequilibrados. No caso de translocação robertsoniana entre cromossomas acrocêntricos homólogos (por exemplo 21;21), todos os gâmetas vão ter uma composição cromossómica anormal (Regateiro, 2007).

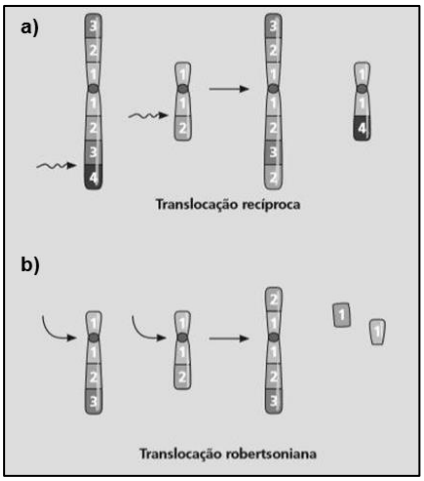


Figura 6 – Imagem ilustrativa de uma translocação recíproca e de uma translocação robertsoniana. a) Na translocação recíproca à troca recíproca de segmentos entre dois cromossomas não homólogos; **b)** na translocação robertsoniana há uma quebra perto ou no centrómero e subsequente fusão dos braços longos no local de quebra [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.2.2.6. Isocromossoma

Os isocromossomas (Figura 7) possuem a deleção de um braço e duplicação do outro, tendo os dois braços uma constituição igual. A alteração surge devido à divisão transversal do centrómero separando o braço longo para um lado e o braço curto para outro (Regateiro, 2007). Os isocromossomas geralmente não são compatíveis com a vida devido à extensa deleção de material genético, exceptuando o isocromossoma do cromossoma X (Regateiro, 2007).

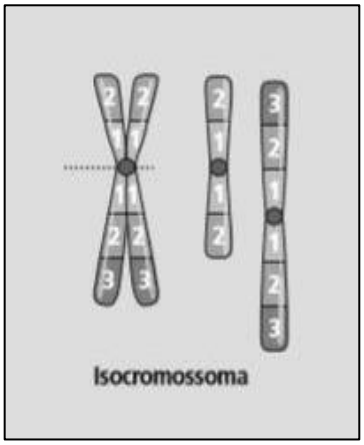


Figura 7 – Imagem ilustrativa de um isocromossoma. Num isocromossoma o material dos dois braços tem igual constituição a partir do centrómero [adaptado de (Regateiro, 2007)].

1.3. Microdeleções e Microduplicações

As microdeleções e microduplicações cromossómicas são deleções/duplicações submicroscópicas, que envolvem geralmente entre 1 a 2 Mb de DNA. Algumas destas microdeleções/microduplicações estão já associadas a variados síndromes genéticos, alguns com fenótipos estabelecidos, que são denominados síndromes de microdeleção/microduplicação. Estes síndromes estão frequentemente associados a défice intelectual, atrasos no desenvolvimento, múltiplas anomalias congénitas, perturbações do espetro autista e diversos achados fenotípicos (Vissers *et al.*, 2003; Lupski e Stankiewicz, 2005; Shuib *et al.*, 2006; Mefford *et al.*, 2007; Klopocki *et al.*, 2008; Nevado *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014).

Os síndromes de microdeleção surgiram com a associação de determinados fenótipos sindrómicos com atraso mental a determinada microdeleção ou microduplicação (de Vries *et al.*, 2005; Willat *et al.*, 2005), entre elas a síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (deleção na região 22q11), síndrome de Prader-Willi (deleção da região 15q11-q13 de origem paterna), síndrome de Angelman (deleção da região 15q11-q13 de origem materna), síndrome de Smith-Magenis (deleção da região 17p11) ou síndrome de Williams-Beuren (deleção da região 7q11), apresentando-se estes como os mais comuns (Willat *et al.*, 2005; Shuib *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2014).

As microdeleções/microduplicações incluem-se numa fração das *Copy Number Variants* (CNV) (Watson *et al.*, 2014), que têm há muito sido associadas com distúrbios genómicos. As CNV são uma classe dos rearranjos genómicos, definidas como deleções e duplicações de segmentos de DNA, que têm menos de 1 kb de tamanho até milhões de pares de base, estando assim presentes num número variável de cópias quando comparados com o genoma representativo da população (Emanuel e Shaikh, 2001; Redon *et al*., 2006; Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007; Stranger *et al*., 2007; Watson *et al.*, 2014). Estas CNV são usualmente flanqueadas por sequências *low-copy repeats* (LCR), que tornam as regiões entre estas sequências susceptíveis a rearranjos (Shaw e Lupski, 2004; Lupski e Stankiewicz, 2005; Sharp *et al.,* 2005; Redon *et al*., 2006; Lupski, 2007; Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007; Kumar, 2008).

Um dos mecanismos que leva à formação de CNV é a recombinação homóloga não-alélica (*non-allelic homologous recombination* – NAHR) (Figura 8), que resulta de *crossing over* desequilibrado entre LCR (Emanuel e Shaikh, 2001; Korf, 2002; Stankiewicz *et al.,* 2003; Lupski e Stankiewicz, 2005; Lee e Lupski, 2006; Reymond *et al.*, 2007; Gu *et al.,* 2008; Klopocki *et al.*, 2008; Hirschfeldova *et al.*, 2011; Watson *et al.*, 2014). Foram

implicados outros mecanismos como causa de diversos rearranjos genómicos (Emanuel e Shaikh, 2001; Gu *et al.,* 2008; Weise *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2014), mas as microdeleções/microduplicações foram demonstradas surgir principalmente através de NAHR (Korf, 2002; Lupski e Stankiewicz, 2005; Lee *et al.,* 2007; Lupski, 2007; Klopocki *et al.*, 2008; Hirschfeldova *et al.*, 2011).

Os níveis de expressão génica podem ser afectados, como consequência de uma CNV, por diferentes mecanismos como alterações na dosagem génica, interrupção génica, efeitos de posição, entre outros (Lupski e Stankiewicz, 2005; Redon *et al*., 2006; Stranger *et al*., 2007; Kumar, 2008). A maioria das microdeleções causam haploinsuficiência do gene ou dos genes envolvidos sendo que a cópia do gene intacta não consegue produzir uma quantidade de proteína para assegurar a função normal, o que resulta em doenças genómicas (Freeman *et al.,*2006; Theisen e Shaffer, 2010; Nevado *et al.*, 2014).

A mesma microdeleção ou microduplicação pode apresentar uma variabilidade de expressão e de penetrância (Redon *et al*., 2006; Nevado *et al.*, 2014; Shawky, 2014), isto deve-se não só à quantidade de material genético perdido ou ganho, respetivamente (Shuib *et al.*, 2006; Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007; Boggula *et al.*, 2014), mas também a fatores epigenéticos, entre outros fatores (Shawky, 2014). Contudo, as microduplicações parecem apresentar uma expressão fenotípica mais variável e uma penetrância incompleta, bem como originar fenótipos clínicos menos severos quando comparadas com as microdeleções, o que leva há existência de mais síndromes de microdeleção conhecidos do que síndromes microduplicações (Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007; Weise *et al.*, 2012).

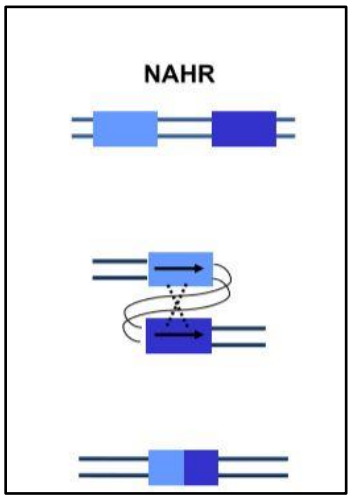


Figura 8 – Representação esquemática do mecanismo recombinação homóloga não-alélica (NAHR), indicado como um dos principais mecanismos de formação de microdeleções/microduplicações. As linhas representam as duas cadeias do DNA e os rectângulos representam *low copy repeats* (LCR). Estes LCR alinham-se de forma não-alélica e a subsequente recombinação leva a uma deleção ou duplicação [adaptado de (Gu *et al.,* 2008)].

1.4. Citogenética convencional

A citogenética é o ramo da Biologia que se dedica ao estudo do material genético a nível celular. Esta pode analisar quer as consequências de uma meiose anómala que produz gâmetas com composição cromossómica anormal em número ou estrutura, o que causa as alterações pré-zigóticas (Gardner *et al.*, 2011); quer alterações mitóticas que originam alterações pós-zigóticas (mosaicos).

Em 1882 foram registadas imagens dos cromossomas humanos em mitoses de células tumorais por Walter Flemming (Regateiro, 2007), tendo em 1888 surgido o termo "cromossomas" (grego *chromos* que significa cor e *soma* que significa corpo), atribuído por Waldeyer, depois do desenvolvimento de técnicas que permitiam corar os cromossomas (Ponnuraj, 2011). A descrição do número correto de cromossomas do Homem foi feita em 1956, por Tijo e Levan (Ponnuraj, 2011) e três anos mais tarde, Lejeune e os seus colaboradores fizeram a primeira associação entre patologia e cromossomas, com a observação de um cromossoma 21 extra em pacientes com Síndrome de Down, condição já descrita em 1866 por John Langdon Down (Regateiro, 2007).

Como já referido, a distinção dos cromossomas começou por ser feita em cromossomas corados que se ordenavam em 7 grupos (de A a G) (Shaffer *et al.*, 2013), mas a evolução das técnicas de bandagem permitiu uma melhor identificação de alterações cromossómicas, como deleções, duplicações e inversões. Estes avanços técnicos foram importantes na evolução da capacidade de diagnóstico da citogenética clínica e na evolução da nomenclatura cromossómica. A representação esquemática do padrão de bandas é o ideograma. A organização dos cromossomas com o par correspondente é designada como cariograma (Figura 9) (Gardner et al., 2011). O termo cariótipo é usado para designar a constituição cromossómica (46, XX ou 46, XY no caso normal).

O cariótipo é a análise de citogenética convencional e baseia-se na observação ao microscópio de células em metafase, para deteção de alterações numéricas e estruturais através da contagem de cromossomas e observação das bandas (Figura 9), respetivamente. Esta técnica permite detetar alterações estruturais com um tamanho mínimo de 5 Mb, podendo a resolução das bandas depender de vários outros fatores. Em 1976 foi introduzida a alta resolução por Yunis (Regateiro, 2007), possibilitando o estudo de rearranjos cromossómicos mais subtis (Theisen e Shaffer, 2010). Isto foi possível através da sincronização de ciclos celulares de células em cultura, conseguindo assim cromossomas com uma resolução de aproximadamente 800 bandas (Shaffer *et al.*, 2013). Com as técnicas de citogenética molecular foi possível ultrapassar a barreira da resolução das

técnicas de citogenética convencional (Korf, 2002; Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007; Pohovski *et al.*, 2013; Boggula *et al.*, 2014).

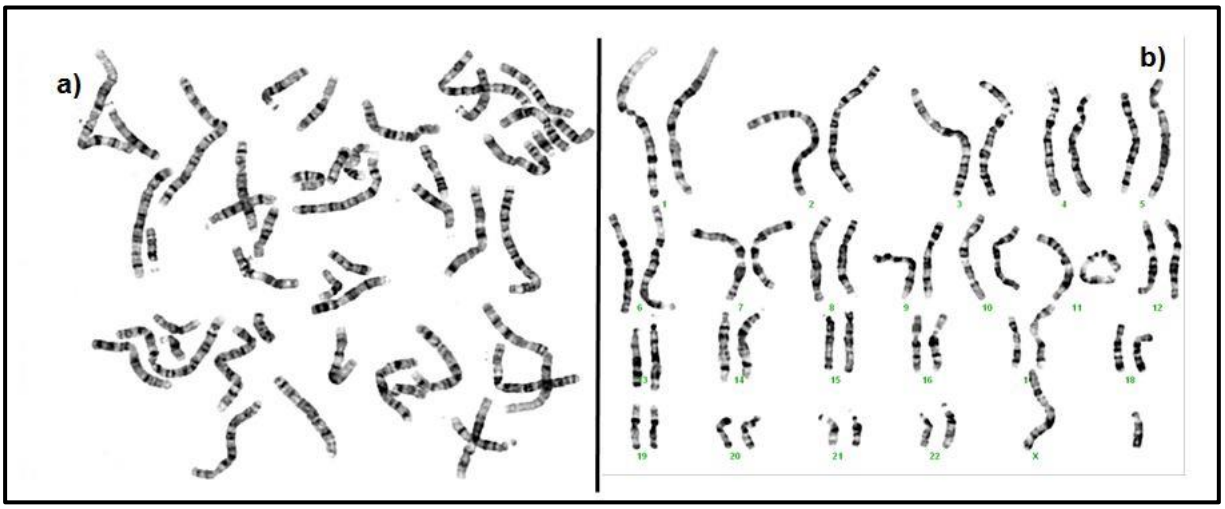


Figura 9 –a) Metafase de células de sangue periférico humano com bandas G, observada ao microscópio. **b) Cariograma com bandas G de uma amostra de sangue periférico de um indivíduo normal do sexo masculino**, com o cariótipo 46,XY (imagens cedidas pelo laboratório de Citogenética do CGMJM-CHP).

1.5. Citogenética molecular

A citogenética molecular iniciou-se nos anos 80 com o desenvolvimento da técnica *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) (Regateiro, 2007), que consiste na hibridação com sondas marcadas com fluorocromos para observação de regiões cromossómicas específicas com recurso ao microscópio de fluorescência. Nesta técnica pode ser usada uma sonda ou uma combinação de diversas sondas, marcadas por fluorocromos diferentes (Regateiro, 2007).

Ao longo dos anos houve o desenvolvimento de novas técnicas e atualmente existem outras técnicas de citogenética molecular, entre elas o *array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH), a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), que, apesar de ser uma técnica de biologia molecular, é muito utilizada em laboratórios de citogenética, entre outrasvtécnicas. Estas duas técnicas permitem uma avaliação mais precisa das variações no número de cópias em diferentes regiões, tornando-se uma boa escolha nas análises de rotina de regiões subteloméricas e microdeleções (Pohovski *et al.*, 2013).

Estas técnicas permitiram um aumento da deteção de alterações submicroscópicas (de Vries *et al.*, 2005; Theisen e Shaffer, 2010; Jehee *et al.*, 2011; Boggula *et al.*, 2014), que por técnicas de citogenética convencional não seriam detetadas. O avanço da citogenética molecular foi uma mais-valia para os testes laboratoriais, avaliação clínica, diagnóstico e prognóstico dos doentes.

1.6. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

A técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) foi descrita pela primeira vez por Schouten e colaboradores em 2002 (Schouten *et al.*, 2002). Atualmente, já se encontram comercialmente disponíveis mais de 300 painéis para diferentes aplicações, disponibilizados pela MRC-Holland (Theophilus e Rapley, 2011; Stuppia *et al.*, 2012). O MLPA é um método baseado na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) multiplex que utiliza cerca de 50 sondas, cada uma específica para uma sequência, o que permite detetar alterações no número de cópias de várias sequências de DNA ou RNA humano numa só reação (Schouten *et al.*, 2002; Jankowski *et al.*, 2008; Coffa e van den Berg, 2011; Gardner *et al.*, 2011; Stuppia *et al.*, 2012; Khouzani *et al.*, 2014). Esta técnica pode ser resumida e dividida em seis passos (Figura 10):

1. Desnaturação do DNA;
2. Hibridação das sondas com o DNA;
3. Ligação das sondas hibridadas;
4. Amplificação PCR das sondas ligadas;
5. Separação por eletroforese capilar;
6. Análise e interpretação dos resultados.

No MLPA, o DNA previamente desnaturado hibrida com o conjunto de sondas. Cada sonda consiste em duas hemisondas de oligonucleótidos (5’ e 3’ hemisondas) separadas por uma única base, que são constituídas por uma sequência específica para o DNA alvo ou sequência de hibridação, uma sequência terminal universal onde se vai ligar o *primer*, e uma ou ambas as sondas possuem uma sequência *stuffer* (Sellner e Taylor, 2004; Jankowski *et al.*, 2008). Esta sequência *stuffer* apresenta um tamanho variável permitindo a obtenção de fragmentos de diferentes tamanhos no final da reação, normalmente entre 130 a 500 pares de base (bp), necessários para permitir a separação eletroforética. Se cada hemisonda hibridar adjacentemente com o DNA alvo, vão depois ser ligadas pela enzima Ligase-65, formando assim um fragmento. No MLPA não é o DNA que é amplificado e quantificado, mas sim as sondas adicionadas, que só são amplificadas se as duas hemisondas estiverem ligadas, formando um fragmento, ou seja, se a sequência alvo estiver presente. O facto de ser necessária a ligação das duas hemisondas em locais adjacentes para que o fragmento seja amplificado torna a técnica mais específica (Schouten *et al.*, 2002; Sellner e Taylor, 2004; Theophilus e Rapley, 2011; Stuppia *et al.*, 2012). Assim, o fragmento pode então ser

amplificado por PCR usando *primers*, em que um dos *primers* está marcado com fluorescência, permitindo a visualização dos fragmentos durante a separação eletroforética. Como todos os fragmentos têm sequências terminais iguais (sequência terminal universal) é possível uma amplificação simultânea com apenas um par de *primers* (Schouten *et al.*, 2002). O uso de apenas um par de *primers* torna a reação de amplificação bastante robusta (Hills *et al.*, 2010) e elimina os problemas com a desigual eficiência de amplificação causada pelos múltiplos pares de *primers* (Theophilus e Rapley, 2011).

Os produtos resultantes da reação de amplificação vão ser posteriormente separados, por tamanho, através da eletroforese capilar. Esta separação é realizada num sequenciador genético que vai dar origem a um eletroferograma específico. O eletroferograma obtido consiste num padrão de picos no qual o tamanho ou área dos picos derivam da medição da fluorescência dos fragmentos resultantes da PCR (Stuppia *et al.*, 2012). Os dados obtidos são posteriormente "normalizados" pela normalização intra-amostra, que estabelece a comparação entre o sinal relativo de cada sonda na amostra e o sinal relativo das sondas de referência; e pela normalização inter-amostra que compara os sinais relativos de cada sonda na amostra com os sinais relativos de cada sonda nas amostras controlo (Schouten *et al.*, 2002; Sellner e Taylor, 2004; Coffa e van den Berg, 2011; Stuppia *et al.*, 2012). Assim, a altura ou área relativa dos picos será proporcional ao número de cópias das sequências alvo presentes na amostra. Os controlos usados são de indivíduos normais, com descendência normal, onde se espera que exista o número de cópias normal das sequências de DNA alvo que estão a ser analisadas (Coffa e van den Berg, 2011). Estas amostras controlo de indivíduos saudáveis são muito importantes para originar resultados fiáveis, uma vez que pequenas diferenças entre diferentes experiências podem alterar o padrão de picos (Theophilus e Rapley, 2011). Desta forma, é possível avaliar que regiões apresentam o número de cópias alterado.

Os painéis de MLPA têm também presentes fragmentos que permitem o controlo interno da qualidade da reação, dando-nos informação sobre a eficiência da reação e a quantidade de DNA usado (Stuppia *et al.*, 2012). O fragmento de referência de 92 bp forma uma marca de referência para comparar com os outros fragmentos controlo. Os quatro fragmentos Q (64, 70, 76 e 82 bp de tamanho) são fragmentos de controlo de quantidade (*Quantity Control-Fragments*), sendo a altura dos picos inversamente proporcional à quantidade de DNA. Os dois fragmentos D (*Denaturation Control Fragments*), de 88 e 96 bp de tamanho, são compostos por sequências com "ilhas CpG", sendo que estas ilhas são difíceis de desnaturar, o que vai indicar problemas na desnaturação da amostra de DNA quando os respetivos picos estiverem diminuídos. Por fim, existem os fragmentos de 100 e

105 bp, que corresponde à amplificação de regiões específicas nos cromossomas X e Y, respetivamente.

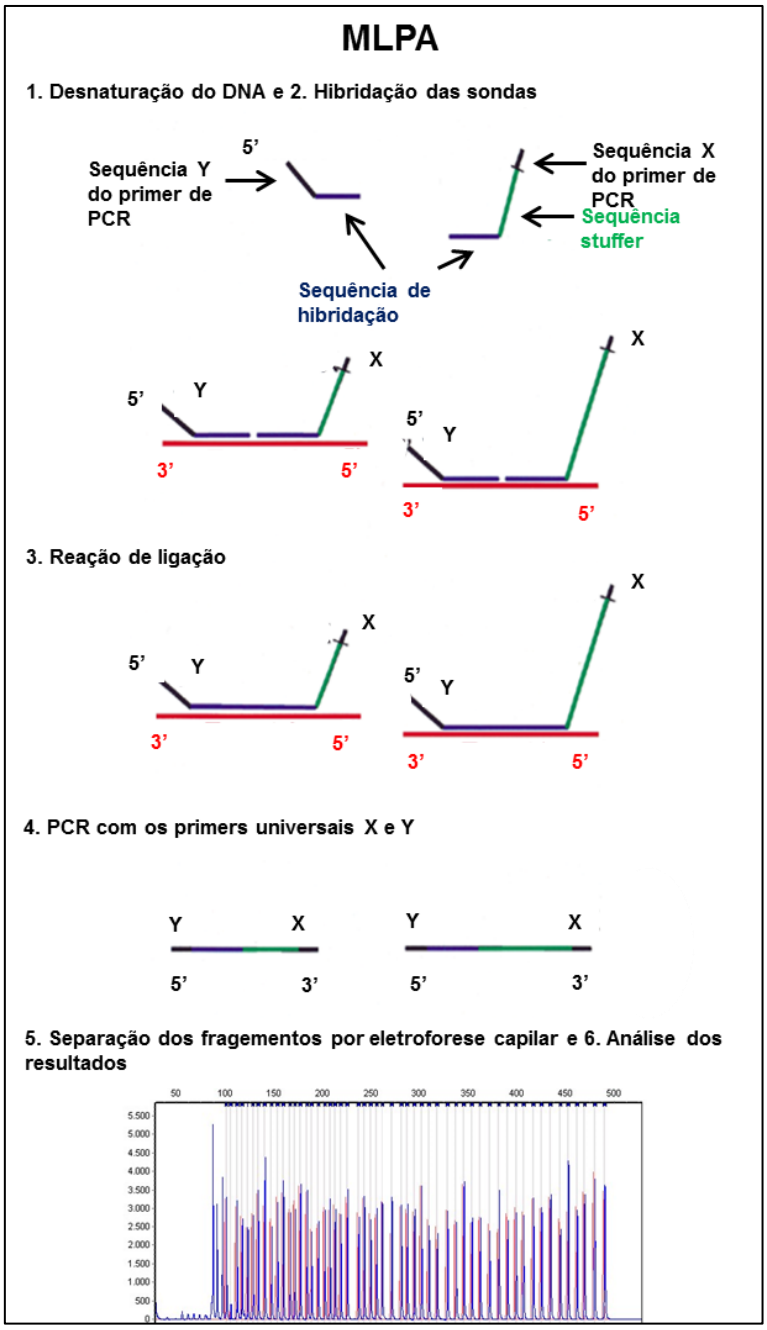


Figura 10 - Principais passos da reação de MLPA. Na primeira etapa, o DNA da amostra é desnaturado (1) e é posteriormente adicionada a mistura de sondas. As sondas vão hibridar com as sequências alvo (2), que vão depois ser ligadas pela enzima ligase-65 durante a reação de ligação (3). De seguida ocorre a PCR com os *primers* universais (4), e apenas as sondas ligadas serão amplificadas. Por último os produtos de amplificação são separados por eletroforese capilar (5) e os resultados analisados (6) (adaptado de Schouten *et al.*, 2002).

Na análise dos resultados espera-se que o sinal da sonda esteja reduzido numa proporção de aproximadamente 0,5 em relação ao controlo se houver uma deleção heterozigótica da sequência alvo e um aumento de aproximadamente 1,5 na proporção se houver uma duplicação heterozigótica. No caso de uma deleção homozigótica ou hemizigótica haverá uma ausência do pico específico para a sequência alvo, quando comparada com uma amplificação normal do controlo. Se estiverem presentes duas cópias da sequência alvo, sendo normal, espera-se uma intensidade do sinal relativo igual ao controlo. Os índices das sondas abaixo de 0,75 e acima de 1,25 são indicadores "estimados" de uma deleção ou duplicação, respetivamente.

Uma das principais aplicações do MLPA é a detecção de alterações do número de cópias, existindo painéis para diversas regiões e direcionados para diferentes patologias, como os painéis para microdeleções (por exemplo, P245 e P297) e regiões subteloméricas (por exemplo, P036 e P070). Para além da quantificação do número de cópias, o MLPA está também disponível para outras aplicações:

- Genotipagem de mutações pontuais e SNPs;
- Deteção do estado de metilação (MS-MLPA);
- Quantificação relativa de mRNA (RT-MLPA).

O MLPA apresenta algumas limitações, entre elas:

- Como as sondas usadas são limitadas em tamanho podem não detetar rearranjos mais complexos, que se encontrem total ou parcialmente fora da sequência alvo e não serem assim suficientes para entender toda a causa subjacente da doença (Khouzani *et al.*, 2014);
- Não deteta alterações estruturais equilibradas, uma vez que se baseia na comparação de quantidade de DNA e os rearranjos equilibrados produzem alteração nas sequências e não no número de cópias (Hirschfeldova *et al.*, 2011; Stuppia *et al.*, 2012);
- Não é sensível à presença de mosaicismo, uma vez que a presença de células normais pode "disfarçar" a presença de alterações (Stuppia *et al.*, 2012);
- Maior sensibilidade a impurezas e à degradação do DNA que um PCR convencional (Stuppia *et al.*, 2012).

Apesar das limitações, o MLPA provou ser uma técnica bem estabelecida para a detecção de alterações no número de cópias nos genes (Schouten *et al.*, 2002; Hills *et al.*, 2010), apresentando diversas vantagens, nomeadamente:

- Permite a análise simultânea e quantificação relativa de mais de 50 sequências em várias amostras de DNA numa só reação (Theophilus e Rapley, 2011; Khouzani *et al.*, 2014), o que a torna uma técnica bastante reprodutível (Schouten *et al.*, 2002);
- Tem elevado rendimento (Sellner e Taylor, 2004; Theophilus e Rapley, 2011; Stuppia *et al.*, 2012);
- Apresenta resultados fiáveis (Jehee *et al.*, 2011);
- É fácil e rápida de realizar, sendo o seu protocolo idêntico para diferentes aplicações (Theophilus e Rapley, 2011) e estando os resultados disponíveis em 24 horas (Hills *et al.*, 2010; Coffa e van den Berg, 2011; Gardner *et al.*, 2011; Jehee *et al.*, 2011; Theophilus e Rapley, 2011; Stuppia *et al.*, 2012; Pohovski *et al.*, 2013; Khouzani *et al.*, 2014);
- É sensível, uma vez que é necessária uma pequena quantidade de DNA (Schouten *et al.*, 2002; Khouzani *et al.*, 2014);
- É específica e com um baixo custo quando comparada com outras técnicas, como a FISH e o aCGH (Schouten *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2007; Pohovski *et al.*, 2013).

Desde que foi descrita em 2002 (Schouten *et al.*, 2002) já foi usada em diversos estudos e é recomendada por vários autores como um método de rastreio citogenético eficaz de diversas doenças (Ahn *et al.*, 2007; Stuppia *et al.*, 2012; Pohovski *et al.*, 2013; Khouzani *et al.*, 2014).

1.6.1. *SALSA® MLPA® P245 Microdeletion syndromes-1 probemix*

Existem diversos painéis de sondas de MLPA que se destinam à deteção de microdeleções/microduplicações. Um dos painéis mais utilizados para a análise dos síndromes de microdeleção mais conhecidos é o P245, sendo o utilizado como método de rastreio de rotina em doentes com suspeita de síndrome de microdeleção no laboratório de Citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães – Centro Hospitalar do Porto, EPE (CGMJM-CHP).

O painel P245 foi desenvolvido para a detecção de vários síndromes de microdeleção em pacientes com atraso no desenvolvimento e/ou atraso mental de origem desconhecida. Este painel contém 50 sondas para 23 regiões cromossómicas diferentes. A sua versão mais recente é a *SALSA® MLPA® PROBEMIX P245-B1 Microdeletion syndromes-1* e foi disponibilizada em 2014.

Os síndromes de microdeleção que são possíveis rastrear com este painel são: síndrome de deleção de 1p36; síndrome de microdeleção de 2p16.1; síndrome de microdeleção de 2q23; síndrome de microdeleção de 2q33; síndrome de microdeleção de 3q29; síndrome de microdeleção de 9q22.3; síndrome de deleção de 15q24; síndrome de microdeleção de 17q21; síndrome de “Phelan-McDermid” (22q13); síndrome de “Cri du Chat” (5p15); síndrome “DiGeorge” (22q11); região distal de 22q11; região 2 de “DiGeorge” (10p14); síndrome de “Langer-Giedion” (8q); síndrome de “Miller-Dieker” (17p); síndrome de microdeleção de NF1 (17q11.2); síndrome de “Prader-Willi / Angelman” (15q11.2); síndrome de RETT, síndrome de duplicação MECP2 (Xq28); síndrome de “Rubinstein-Taybi” (16p13.3); síndrome de “Smith-Magenis” (17p11.2); síndrome de “Sotos” (5q35.3); síndrome de “Williams” (7q11.23); síndrome de “Wolf-Hirschhorn” (4p16.3).

1.6.2. *SALSA® MLPA® P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix*

O painel P297 foi criado para o rastreio de microdeleções/microduplicações em diversos genes, em diferentes regiões cromossómicas. Nos últimos anos foram descobertas novas regiões que estão relacionadas com síndromes de microdeleção e este painel pode ser usado para a análise de algumas dessas regiões. A última versão do painel, disponibilizada em 2016, é a *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297-C1 Microdeletion Syndromes-2*. As sondas presentes no painel P297 têm produtos de amplificação entre 115 e 492 bp e contém ainda nove fragmentos de controlo interno. As 51 sondas presentes têm como alvo dez regiões cromossómicas. As regiões cromossómicas, os genes alvo e o número de sondas presente encontram-se descritos na Figura 11.

Cromossoma/Banda	Gene alvo	Nº sondas
1q21.1 (TAR)	*PDE4DIP*	1
	HFE2	1
	PEX11B	2
	CD160	1
1q21.1	*PRKAB2*	1
	FMO5	1
	BCL9	1
	ACP6	1
	GJA5	1
	GJA8	1
3q29	*PAK2*	1
	DLG1	1
7q36.1	*CNTNAP2*	2
12p11.23	*ASUN*	1
	PPFIBP1	1
15q13	*TJP1*	2
	FAN1	2
	TRPM1	2
15q13	*KLF13*	1
	CHRNA7	2
	SCG5	2
15q24.1	*PML*	2
16p11.2	*HIRIP3*	1
	DOC2A	1
	MAZ	1
	MAPK3	1
	MVP	1
16p12	*IL21R*	2
	PALB2	3
17q12	*LHX1*	1
	AATF	2
	HNF1B	4
18q21.2	*TCF4*	2
20p12.2	*PAK7*	2

Figura 11 - Sondas presentes no painel P297 ordenadas de acordo com a localização cromossómica. Na figura está descrita a banda cromossómica onde se encontra a sequência alvo, o gene alvo e o número de sondas presentes [adaptado de: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=_tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID=_MTs_fFJ6fWI].

Os síndromes de microdeleção que são rastreadas por este painel incluem: síndrome de TAR (1q21.1); síndrome de microdeleção 1q21.1; síndrome de microdeleção 3q29; síndrome de microdeleção 15q13.3; síndrome de microdeleção 16p11.2-p12.2; síndrome de microdeleção 17q12; síndrome de Pitt-Hopkins.

Algumas das regiões alvo do painel P245 estão também presentes no painel P297 e encontram-se representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Regiões alvo comuns do painel P297 e do painel P245. Nesta tabela apresentam-se as regiões alvo, respetivos genes alvo dessas regiões e o número de sondas para cada gene, existente em cada um dos painéis.

Região alvo	Gene alvo	P297 (nº sondas)	P245 (nº sondas)
3q29	*DLG1*	1	2
	PAK2	1	0
15q24	*PML*	2	0
	SEMA7A	0	1
	CYPIA	0	1

1.6.2.1. Banda 1q21.1

Esta banda localiza-se no braço longo do cromossoma 1 e divide-se em duas regiões: a região proximal 1q21.1 (Figura 12), que contém 16 genes, estando as deleções nesta região associadas ao síndrome de Trombocitopenia e Ausência de Rádio (TAR) (OMIM #274000); e a região distal 1q21.1 (Figura 13), que compreende cerca de 13 genes, estando as deleções ou duplicações associadas aos síndromes de microdeleção e microduplicação 1q21.1 (OMIM #612474; OMIM #612475). O painel P297 tem presentes 11 sondas para esta banda cromossómica, sendo que cinco destas sondas rastreiam a região proximal associada ao síndrome de TAR. As restantes seis sondas estão associadas aos síndromes de microdeleção e microduplicação 1q21.1 e os genes alvos localizam-se na região distal da banda 1q21.1.

A deleção associada ao síndrome de TAR envolve normalmente 11 genes e uma extensão variável (Watson *et al.*, 2014). No entanto, deleções e duplicações nesta região da banda 1q21.1 já foram associadas a outros fenótipos que não o síndrome de TAR (Rosenfeld *et al.,* 2012). As sondas contidas no painel P297 para o síndrome de TAR têm quatro genes alvo: *PDE4DIP; HFE2; PEX11B* e *CD160* (Figura 12). Para o gene *PEX11B* estão presentes duas sondas.

Os síndromes de microdeleção e microduplicação 1q21.1 compreendem, normalmente, uma deleção que se inicia a 500 kb distalmente do gene *CD160* (Rosenfeld *et al.,* 2012), tendo a deleção entre 1,35 e 1,65 Mb de tamanho (Mefford *et al.,* 2008; Nevado *et al.*, 2014). O painel P297 contém sondas para seis genes diferentes envolvidos na microdeleção/microduplicação: *PRKAB2; FMO5; BCL9; ACP6; GJA5* e *GJA8* (Figura 13).

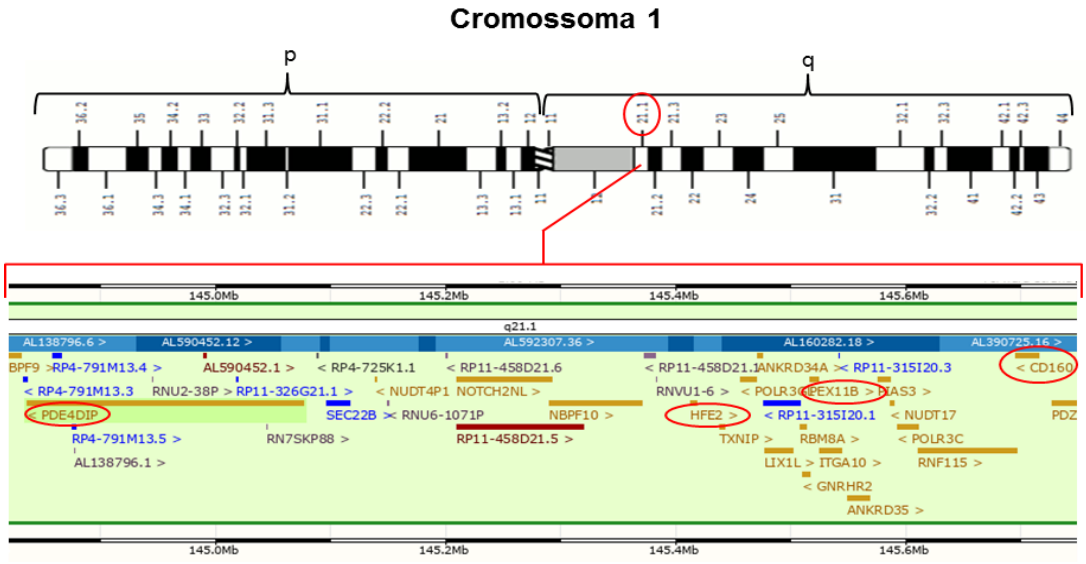


Figura 12 – Representação esquemática da localização cromossómica da banda 1q21.1, relativa à região proximal associada ao síndrome de TAR, e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta região. O ideograma do cromossoma 1 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 1q21.1. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo) são quatro (adaptado de http://blog.kokocinski.net/media/blogs/a/chromosome1.gif e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Outubro 2017).

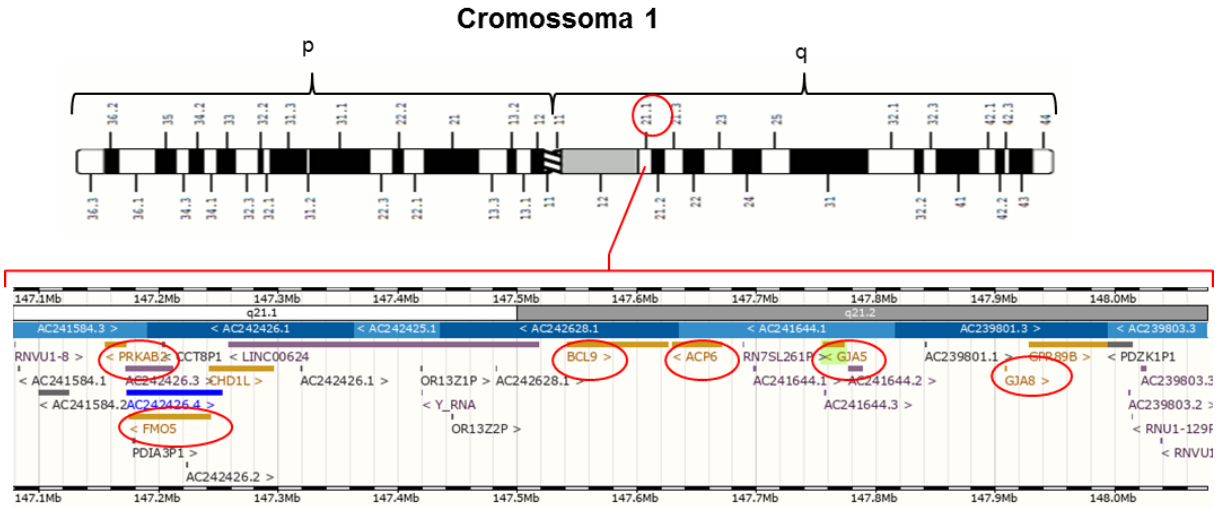


Figura 13 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 1q21.1, relativa à região distal associada ao síndrome de microdeleção/microduplicação 1q21.1, e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta região. O ideograma do cromossoma 1 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 1q21.1. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo) são seis (adaptado de http://blog.kokocinski.net/media/blogs/a/chromosome1.gif e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Outubro 2017).

1.6.2.2. Banda 3q29

Para a banda 3q29 estão presentes duas sondas para dois genes diferentes: *PAK2* e *DLG1* (Figura 14). Esta banda localiza-se na região terminal do braço longo do cromossoma 3 (Figura 14) e está associada aos síndromes de microdeleção e microduplicação 3q29 (OMIM #609425; OMIM #611936), que envolvem normalmente 22 genes e tem, geralmente, um tamanho entre 1,5 a 1,6 Mb (Willat *et al.*, 2005; Ballif *et al.*, 2008; Weise *et al.*, 2012; Nevado *et al.*, 2014; Mulle *et al.*, 2016).

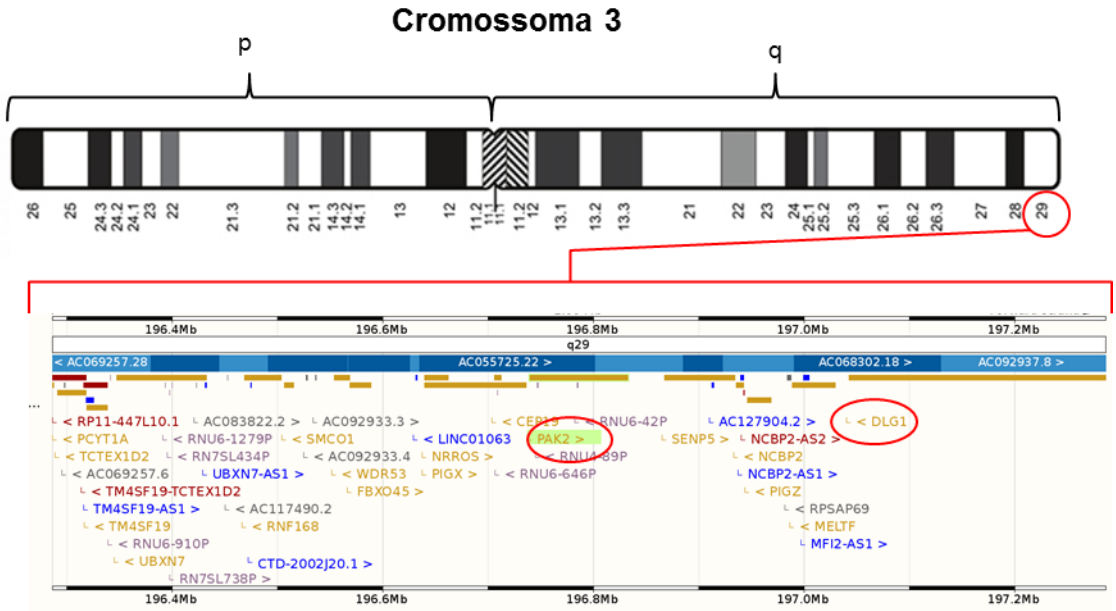


Figura 14 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 3q29, associada ao síndrome de microdeleção/microduplicação 3q29, e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 3 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 3q29. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo) são dois (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom3ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.3. Banda 7q36.1

A banda 7q36.1 contém um gene longo que se encontra localizado também na banda 7q35, o gene *CNTNAP2* (Figura 15), sendo esse o gene alvo das duas sondas presentes no painel P297. Alterações nesta banda, localizada no braço longo do cromossoma 7 (Figura 15), não estão ainda associadas a um síndrome de microdeleção/microduplicação, mas as alterações no número de cópias deste gene foram já detetadas em indivíduos com esquizofrenia e autismo (Friedman *et al.,* 2008; International Schizophrenia Consortium, 2008).

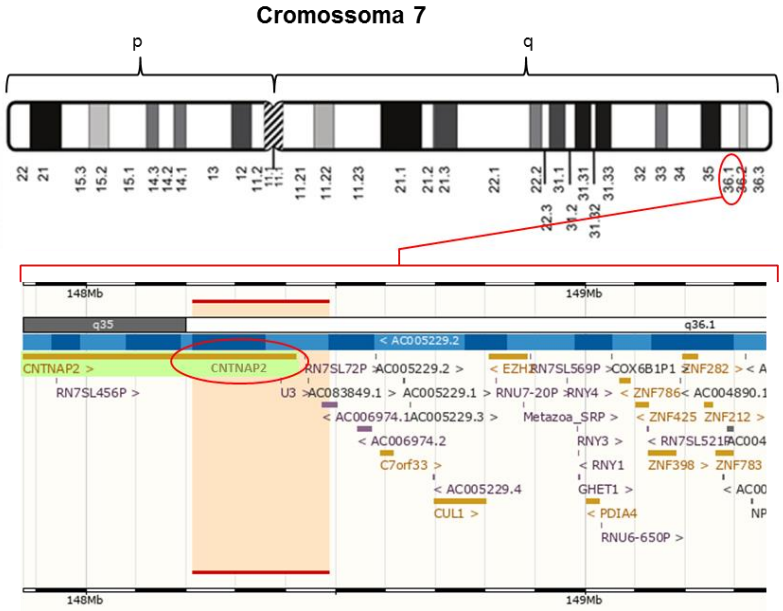


Figura 15 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 7q36.1 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 7 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 7q36.1. O gene alvo das sondas neste painel (em baixo) é um (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom7ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.4. Banda 12p11.23

Esta banda cromossómica localiza-se no braço curto do cromossoma 12 (Figura 16) e tal como a banda 7q36.1, não está ainda associada a um síndrome de microdeleção/microduplicação. As alterações do número de cópias em genes desta banda estão recorrentemente associados a fenótipos de esquizofrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008). O painel P297 contém duas sondas para dois genes alvo nesta região: *ASUN* e *PPFIBP1* (Figura 16).

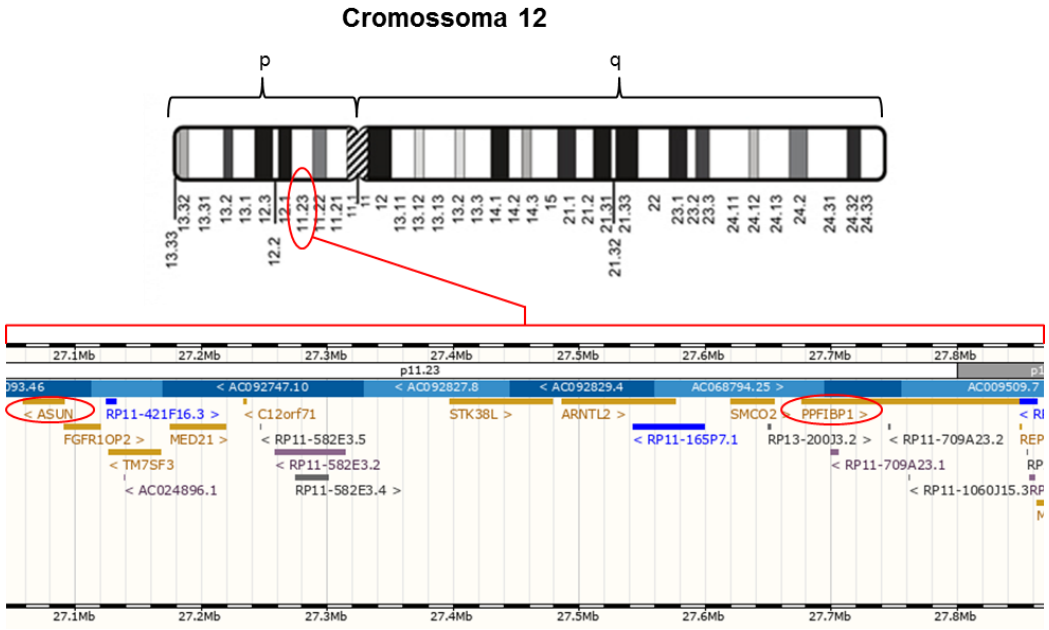


Figura 16 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 12p11.23 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 12 (em cima), com a indicação do braço longo (q) e braço curto (p), onde está assinalada a banda 12p11.23. Os genes alvos das sondas neste painel (em baixo) são dois (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom12ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.5. Região 15q13

A região 15q13 localiza-se no braço longo do cromossoma 15 (Figura 17) e o painel P297 tem 11 sondas para genes localizados em diferentes bandas na região 15q13. Para a banda 15q13.1 tem duas sondas para o gene *TJP1* (Figura 17); e para a banda 15q13.3 tem nove sondas para os genes *FAN1*, *TRPM1, KLF13, CHRNA7* e *SCG5* (Figura 17). A região está já associada a um síndrome de microdeleção 15q13.3 (OMIM #612001), não se esperando que o gene *TJP1* esteja envolvido. A região crítica deste síndrome envolve cerca de sete genes e a deleção tem, geralmente, cerca de 1,5 Mb de tamanho (Sharp *et al.,* 2008; Helbig *et al.,*2009; Shinawi *et al.,* 2009; Nevado *et al.*, 2014).

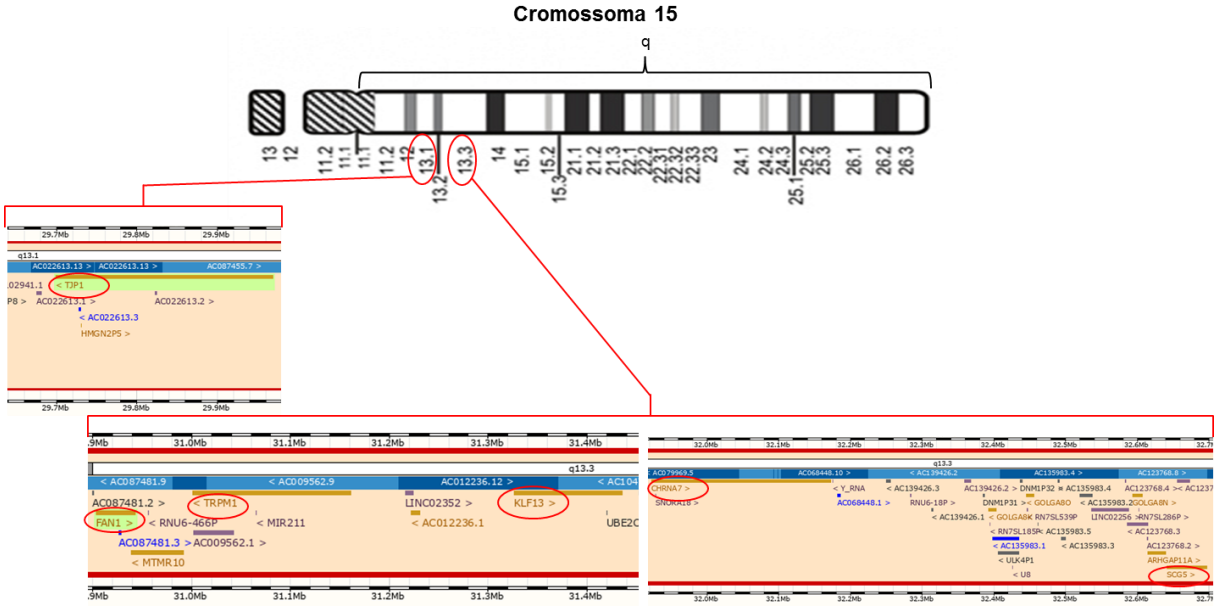


Figura 17 - Representação esquemática da localização cromossómica da região 15q13 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta região. O ideograma do cromossoma 15 (em cima), com a indicação do braço longo (q), onde estão assinaladas as bandas 15q13.1 e 15q13.3. O gene alvo das sondas neste painel (a meio, à esquerda) para a banda 15q13.1 é um. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo) para a banda 15q13.3, associada ao síndrome de microdeleção 15q13.3, são cinco (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom15ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.6. Região 15q24

A região 15q24 já está associada aos síndromes de microdeleção e microduplicação (OMIM #613406, inclui os dois), também denominado de Síndrome de Witteveen-Kolk. A alteração apresenta, geralmente, entre 1,7 a 3,9 Mb de tamanho (Sharp *et al.,* 2007) e pode envolver 32 genes. No entanto, o gene alvo das sondas do painel P297, encontra-se fora da área comum do síndrome de microdeleção/microduplicação 15q24. O gene alvo das duas sondas presentes no painel P297 é o gene *PML*, localizado no braço longo do cromossoma 15, banda 15q24.1 (Figura 18) e a deleção deste gene está associada a défice intelectual (Ravnan *et al.,* 2006).

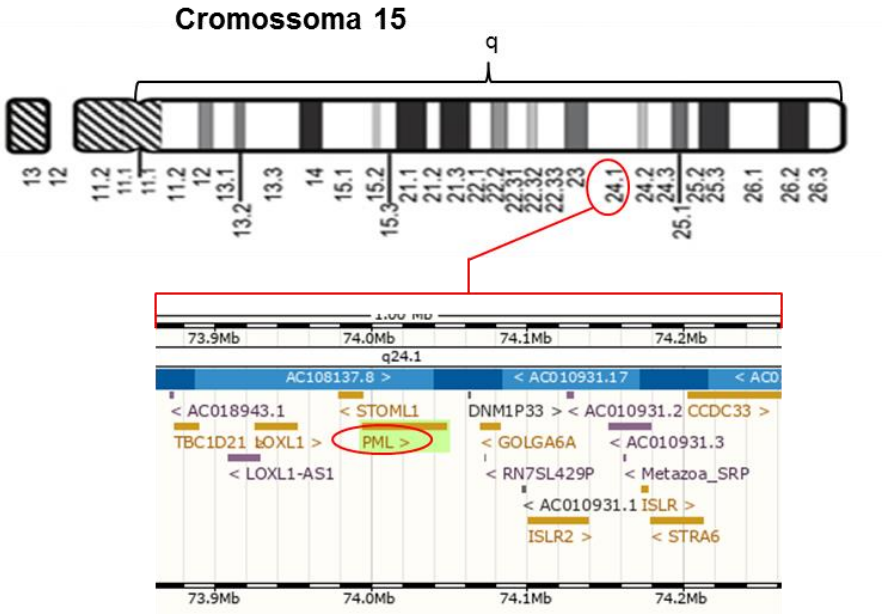


Figura 18 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 15q24.1 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 15 (em cima), com a indicação do braço longo (q), onde está assinalada a banda 15q24.1. O gene alvo das sondas neste painel (em baixo) é um (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom15ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.7. Região 16p11.2/16p12.2

Estas regiões estão associadas ao síndrome de microdeleção 16p11.2-p12.2 (OMIM #613604), que compreende uma deleção com um tamanho variável, entre 7,1 Mb e 8,7 Mb (Ballif *et al.,* 2007; Battaglia *et al.,* 2009; Hempel *et al.,* 2009). Associados a esta região estão também os síndromes de microdeleção e microduplicação 16p11.2 (OMIM #611913), associados ao autismo (Weiss *et al.,* 2008), à obesidade (Walters *et al.,* 2010) e perturbações no neurodesenvolvimento (Shinawi *et al.,* 2010; Golzio *et al.,* 2012). Há várias alterações no número de cópias envolvendo esta região, com tamanhos variáveis e envolvendo diferentes genes, que são responsáveis por diferentes fenótipos (OMIM #136570; OMIM #613444).

O painel P297 tem presentes no total dez sondas para esta região, sendo que tem cinco sondas para a banda 16p11.2 para cinco genes alvo: *MAZ, MVP, HIRIP3, DOC2A* e *MAPK3* (Figura 19); três sondas para a banda 16p12.1 para o gene *PALB2* (Figura 19) e duas sondas para a banda 16p12.2 para o gene *IL21R* (Figura 19).

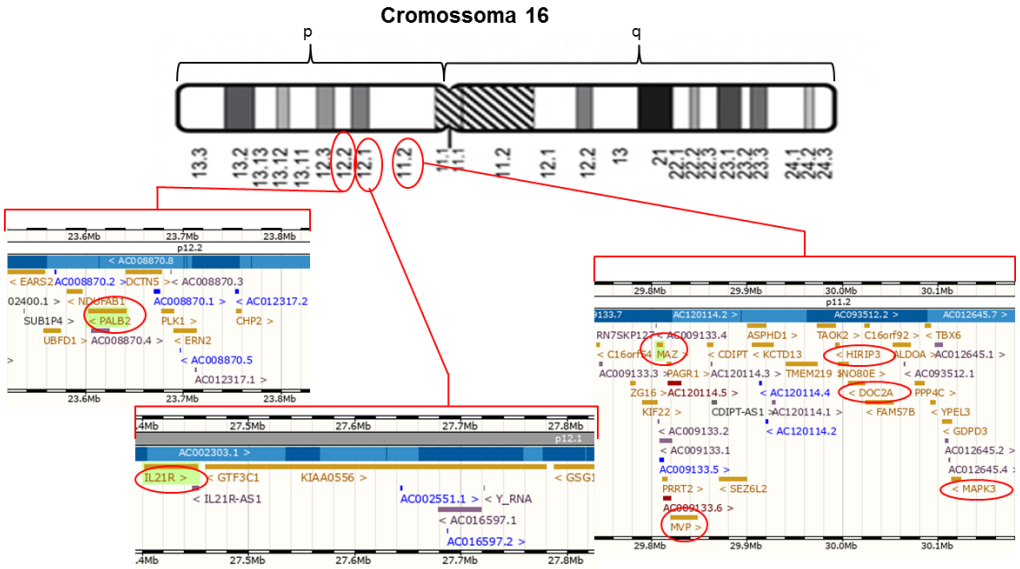


Figura 19 - Representação esquemática da localização cromossómica das regiões 16p11.2, 16p12.1 e 16p12.2, associadas a diversos síndromes, e indicação dos genes alvo do painel P297 para estas regiões. O ideograma do cromossoma 16 (em cima), com a indicação do braço longo (q) e do braço curto (p), onde estão assinaladas as bandas 16p11.2, 16p12.1 e 16p12.2. O gene alvo das sondas neste painel (no meio, à esquerda) para a banda 16p11.2 é um. O gene alvo das sondas neste painel (em baixo, à esquerda) para a banda 16p12.1 é um. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo, à direita) para a banda 16p12.2 são cinco. (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom16ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.8. Banda 17q12

O painel P297 contém sete sondas para a banda 17q12, localizada no braço longo do cromossoma 17 (Figura 20) e já está associada aos síndromes de microdeleção e microduplicação 17q12 (OMIM #614527; OMIM #614526). A deleção/duplicação compreende, normalmente, 17 genes e cerca de 1.5 Mb de tamanho (Mefford *et al.*, 2007; Nevado *et al.*, 2014). Desses 17 genes, o painel P297 permite analisar três genes: *LHX1, AATF* e *HNF1B* (Figura 20). Para o gene *AATF* estão presentes duas sondas e para o gene *HNF1B* estão presentes quatro sondas.

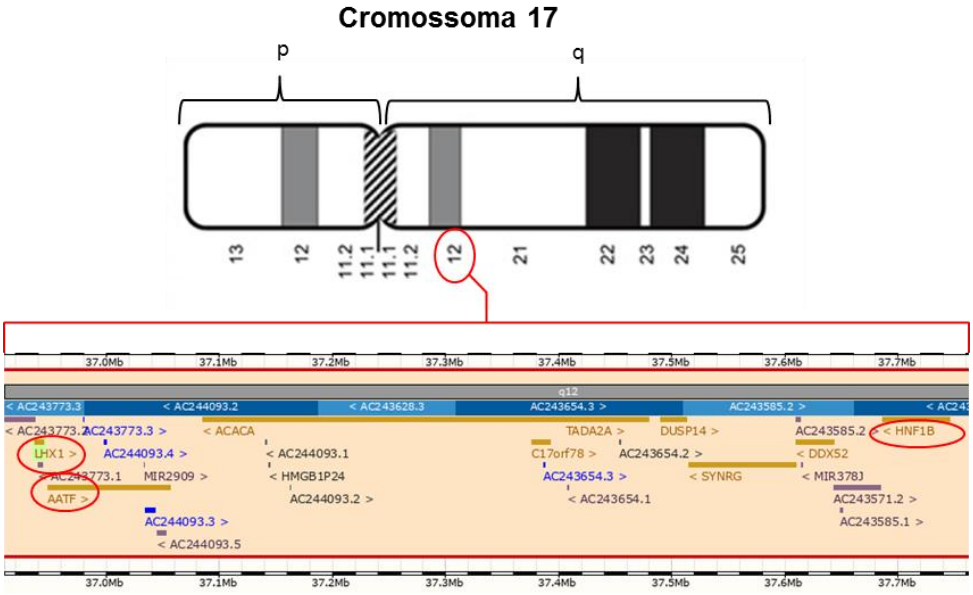


Figura 20 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 17q12 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 17 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 17q12. Os genes alvo das sondas neste painel (em baixo) são três (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom17ISCN09.htmln e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.9. Banda 18q21.2

O gene alvo das duas sondas do painel P297 nesta banda é o *TCF4*, que está localizado no braço longo do cromossoma 18 (Figura 21). Alterações neste gene estão associadas a portadores de um síndrome já descrito, o síndrome de Pitt-Hopkins (SPH) (OMIM #610954) (Giurgea *et al.,* 2008). A deleção na banda 18q21.2, que causa este síndrome, pode envolver outros genes, mas o gene *TCF4* é o responsável pelo fenótipo de SPH (Giurgea *et al.,* 2008).

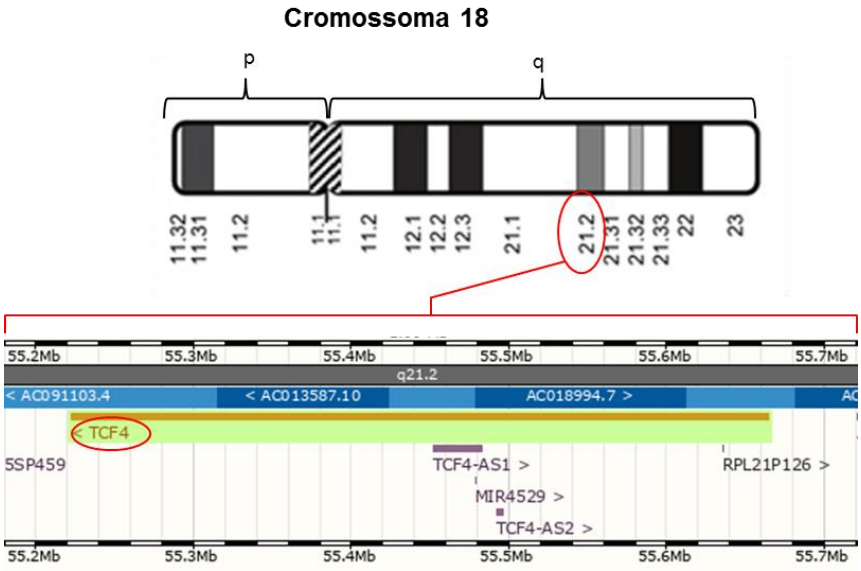


Figura 21- Representação esquemática da localização cromossómica da banda 18q21.2 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 18 (em cima), com a indicação do braço curto (p) e braço longo (q), onde está assinalada a banda 18q21.2. O gene alvo das sondas neste painel (em baixo) é um (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom18ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

1.6.2.10. Banda 20p12.2

Duplicações recorrentes no gene *PAK7* foram reportadas por estarem ligadas a fenótipos de epilepsia (International Schizophrenia Consortium, 2008). Este gene localiza-se na banda 20p12.2, no braço curto do cromossoma 20 (Figura 22), não estando esta banda associada a um síndrome de microdeleção/microduplicação. O painel P297 contém duas sondas para análise do gene *PAK7*. Atualmente o *PAK7*, denomina-se *PAK5*, sendo a designação *PAK7* a ainda proposta pela MRC-Holland.

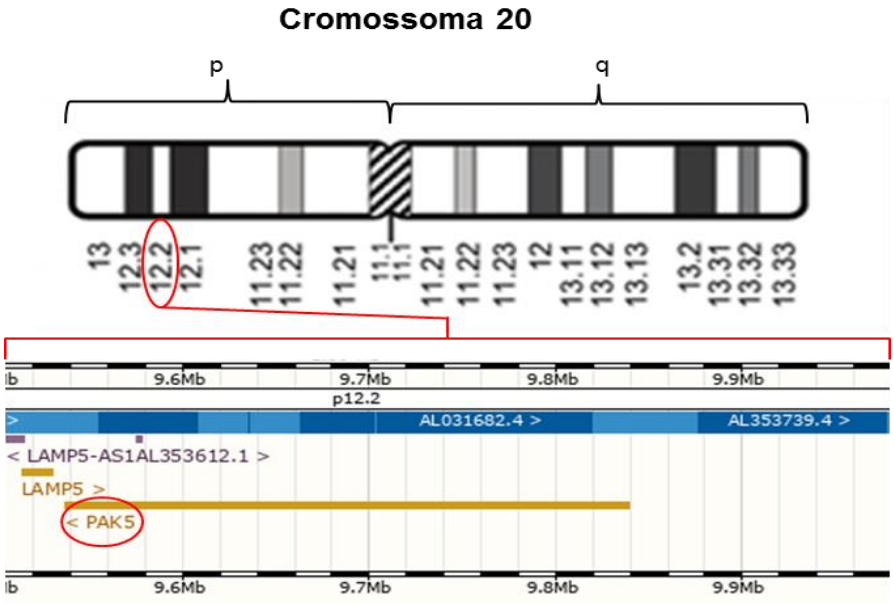


Figura 22 - Representação esquemática da localização cromossómica da banda 20p12.2 e indicação dos genes alvo do painel P297 para esta banda. O ideograma do cromossoma 20 (em cima), com a indicação do braço longo (q) e braço curto (p), onde está assinalada a banda 20p12.2. O gene alvo das sondas neste painel (em baixo) é um, o *PAK5*, sendo que *PAK5* e *PAK7* são sinónimos (adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/Chrom20ISCN09.html e de https://www.ensembl.org/index.html, acedido em Setembro 2017).

2. Objetivos

O objectivo deste trabalho é avaliar a vantagem de aumentar a oferta de rastreios citogenéticos de novos síndromes e regiões cromossómicas, em doentes ainda sem diagnóstico ou em doentes com diagnóstico que possa ser complementado, com a introdução do painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2*, nas análises de rotina do laboratório de Citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães – Centro Hospitalar do Porto, EPE (CGMJM-CHP). Para atingir o objetivo, o trabalho está dividido em quatro partes principais:

- Aplicação do painel P297 em pacientes com suspeita de síndrome de microdeleção/microduplicação, que já efectuaram cariótipo e jforam estudados com o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P245 Microdeletion Syndromes-1,* que permaneçam sem diagnóstico;
- Aplicação do painel P297 em pacientes já com diagnóstico, de forma a complementar ou confirmar o diagnóstico;
- Analisar as alterações encontradas com o painel P297, estudar os progenitores para determinar a origem da alteração e tentar estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo;
- Avaliar a importância do uso do painel P297 combinado com o painel P245 para a pesquisa de microdeleções, como uma forma mais abrangente de rastreio de síndromes de microdeleção/microduplição.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostras Biológicas

De Janeiro de 2016 a Maio de 2017 deram entrada 96 amostras de sangue periférico com indicação de suspeita de síndrome microdeleção/microduplicação no laboratório de Citogenética do CGMJM-CHP, todas elas com um resultado normal no cariótipo e no estudo com o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P245 Microdeletion Syndromes-1*. Deram ainda entrada três amostras de sangue periférico, já com diagnóstico, nas quais foi utilizado o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2* para confirmação ou para complementar o anterior diagnóstico. Assim, foram incluídos 99 casos neste estudo, de aplicação da técnica de MLPA, com o painel P297. O *workflow* da selecção das amostras analisadas e da metodologia utilizada encontra-se na Figura 23.

Foram pedidas amostras de sangue periférico dos progenitores de todos os casos que revelaram uma alteração no estudo com o painel P297. Até ao final do estudo foram recebidas oito amostras de sangue periférico dos progenitores de quatro doentes nos quais se tinha detetado uma alteração. No total, foram analisadas no decorrer deste estudo 107 amostras de sangue periférico.

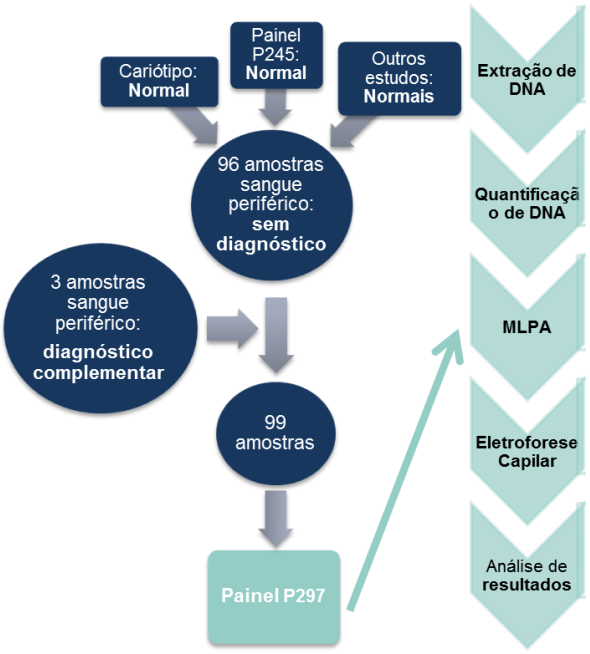


Figura 23 – *Workflow* de selecção das amostras e da metodologia utilizada no trabalho.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA a partir das amostras de sangue periférico foi realizada no *biorobot Qiagen EZ1® Advanced*, utilizando o *Qiagen EZ1® DNA Blood 350 µL Kit*, de acordo com as instruções do fornecedor (Qiagen).

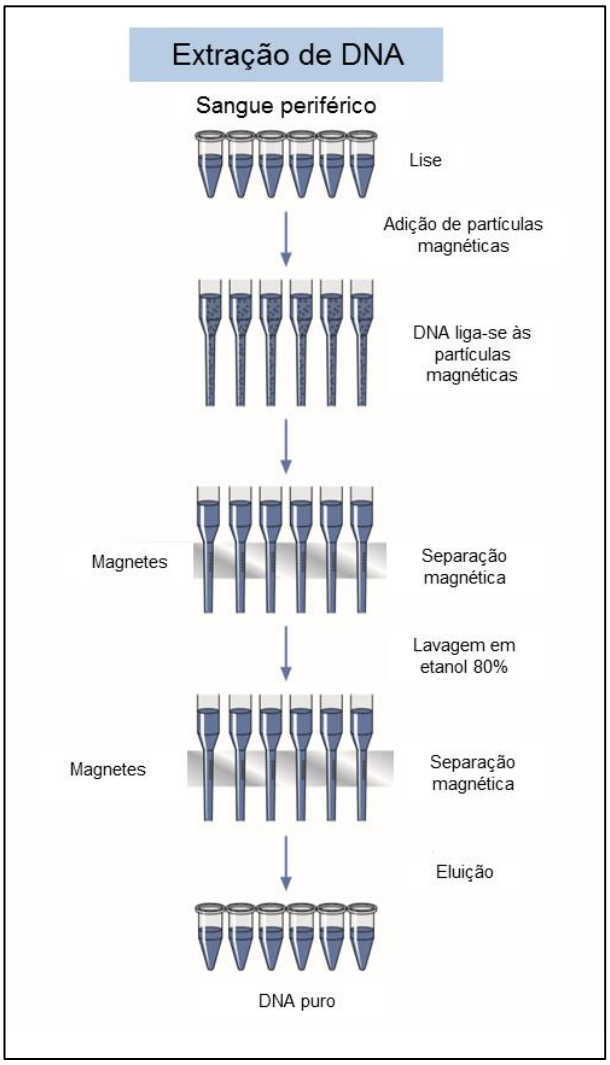


Figura 24 – Principais etapas do processo de extração de DNA com o *biorobot Qiagen EZ1® Advanced* (adaptado de www.qiagen.com)

Inicialmente preparou-se, por cada amostra, dois microtubos de 2 ml (um para a amostra, devidamente identificado com nome e número, e outro para a solução de etanol 80%), uma ponta com filtro e tubo de suporte (eluição da amostra), um microtubo de 1,5 ml (amostra de DNA extraído) e o um cartucho de reagentes (contém tampão de lise, tampão de lavagem, tampão de eluição e partículas magnéticas). Para os microtubos de 2 ml de amostra pipetou-se 350 µL de sangue periférico. De seguida, pipetou-se 1800 µL da solução de etanol 80% para os microtubos de 2 ml. Colocou-se o cartão *EZ1® Advanced DNA Blood Card* no *biorobot Qiagen EZ1® Advanced,* o qual está pré-programado para purificação de DNA. Selecionou-se o programa para extração a partir de 350 µL de sangue periférico, com volume de eluição de 100 µL e com lavagem em etanol a 80% e colocou-se o material necessário nos locais indicados, iniciando-se o processo de extração de DNA.

O processo de extração automático realizado pelo *biorot* (Figura 24) baseia-se na lise celular do sangue total, posterior adição das partículas magnéticas às quais se liga o DNA, havendo uma separação magnética. De seguida há a lavagem (neste estudo a lavagem foi feita com o etanol a 80%) e uma nova separação magnética, seguindo-se o processo de eluição e por fim obtém-se o DNA puro.

3.3. Quantificação e análise da qualidade de DNA

A quantificação de DNA foi efetuada utilizando um espetrofotómetro NanoDrop *ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, USA), tendo sido determinada a concentração e grau de pureza do DNA extraído. O volume de amostra utilizada para a quantificação foi de 2 µL de DNA.

Os ácidos nucleicos e proteínas apresentam uma absorvância máxima aos 260 e aos 280 nm, respetivamente, tendo sido usada a razão das absorvâncias nesses comprimentos de onda como medida do grau de pureza do DNA. Foi também usada a razão das absorvâncias aos 260 e 230 nm, uma vez que a absorvância a 230 nm é indicativa da presença de contaminantes (por exemplo sais de guanidina e fenóis).

3.4. Aplicação da técnica de MLPA

Neste estudo foi usado o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2* para o rastreio de síndromes de microdeleção/microduplicação. A técnica de MLPA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands), tendo sido utilizados em cada aplicação da técnica quatro controlos normais, (dois femininos e dois masculinos) juntamente com as amostras em estudo.

Num microtubo de 200 µL, identificados com o número de amostra e o painel utilizado, diluiu-se o DNA em H_2O a partir dos valores de concentração obtidos na quantificação, de forma a que a quantidade final de DNA fosse de 150 ng (valor definido como ótimo no laboratório) num volume final de 5 µL. As amostras de DNA foram depois colocadas no termociclador a desnaturar a 98ºC durante 5 minutos. Entretanto, preparou-se a mistura de hibridação, sendo composta por 1,5 µL de solução de tampão SALSA MLPA e 1,5 µL de solução de sonda por amostra. Durante a pausa a 25ºC, adicionou-se 3 µL da primeira mistura por amostra, que ficou depois 1 min a incubar a 95ºC, de modo a desnaturar as sondas (reação de desnaturação). No fim deste tempo, a temperatura passou para os 60ºC durante 18 horas para ocorrer a hibridação das sondas com o DNA alvo (reação de hibridação). No dia seguinte, preparou-se a solução da Ligase, composta por 25 µL de dH_2O, 3 µL de solução de tampão A da Ligase-65*,* 3 µL de solução de tampão B da Ligase-65 e 1 µL de solução de Ligase-65 por amostra. Depois da reação de hibridação terminar, adicionou-se 32 µL da mistura por amostra a 54ºC. De seguida, as amostras foram incubadas 15 minutos a 54ºC, para ocorrer a ligação das sondas. Em seguida, inativou-se a enzima ligase-65, incubando-se 5 minutos a 98ºC. Estas duas incubações subsequentes

constituem a reação de ligação das hemisondas que hibridam adjacentemente com a sequência de DNA alvo. Para se realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR), preparou-se a terceira mistura composta por 7,5 µL de dH_2O, 2 µL de PCR *primer mix* e 0,5 µL de solução de enzima Polimerase por amostra, adicionando-se 10 µL desta mistura a cada amostra, a 20ºC no termociclador. Posteriormente iniciou-se o PCR com 35 repetições do seguinte ciclo de temperaturas:

- 30'' a 95ºC (Desnaturação)
- 30'' a 60ºC (Hibridação)
- 60'' a 72ºC (Extensão)

Findos os 35 ciclos, as amostras ficam incubadas a 72ºC durante 20 minutos e o termociclador parou depois a 15ºC. Retiraram-se as amostras do termociclador e reservaram-se a 4ºC no frigorífico até à posterior separação dos fragmentos.

3.5. Separação de fragmentos por Eletroforese Capilar

A separação dos fragmentos resultantes do PCR multiplex é realizada por eletroforese capilar. Para este procedimento, preparou-se uma solução com 1 ml de formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, USA) (estabilização de cadeias simples de DNA) e 30 µL de *Genescan™ 500 Rox™ size standard* (Applied Biosystems, Foster City, USA) (marcador de peso molecular). Numa placa de 96 poços, pipetou-se para cada poço 15 µL da solução de Formamida + Rox 500 e 1 µL de amostra. No sequenciador genético *ABI PRISM™ 3130* (Applied Biosystems, Foster City, USA) realizou-se a eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de amplificação. Os resultados da eletroforese capilar apresentam-se na forma de um eletroferograma (Figura 25).

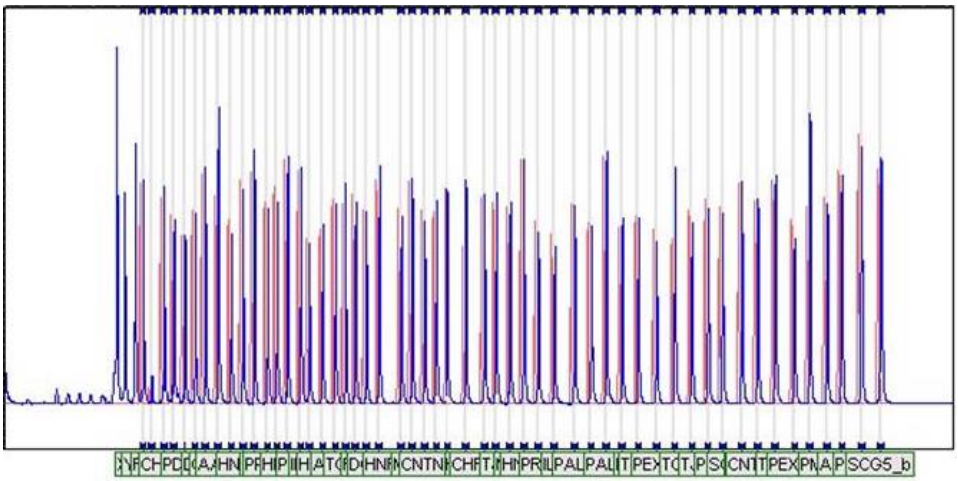


Figura 25 – Eletroferograma de uma amostra analisada com o painel P297. Os picos de fluorescência iniciais dizem respeito aos fragmentos de controlo (fragmentos Q e D e do cromossoma X e Y). Os restantes picos de fluorescência dizem respeito às 51 sondas presentes no painel.

3.6. Análise de resultados

Os eletroferogramas obtidos da electroforese capilar foram tratados com recurso a um *software* de análise de dados, o *software GeneMarker® AFLP/Genotyping Software* (Softgenetics, State College, USA). Neste *software* efetua-se a normalização dos dados obtidos da eletroforese capilar, para a obtenção de dados úteis. A normalização dos dados inclui duas etapas: a normalização intra-amostra, que estabelece a comparação entre o sinal relativo de cada sonda na amostra e o sinal relativo das sondas de referência; e a normalização inter-amostra que, compara os sinais relativos de cada sonda na amostra com os sinais relativos de cada sonda nas amostras de DNA controlo. Após normalização e através do quociente de dosagem da sonda (proporção final de uma sonda na amostra em estudo em comparação com a proporção da mesma sonda nas amostras de DNA controlo), é possível saber se houve uma alteração do número de cópias no DNA alvo. Para calcular o valor dos sinais das sondas utiliza-se a altura dos picos, considerando-se os rácios inferiores a 0,75 e superiores a 1,25 como possíveis indicadores de deleção e duplicação, respetivamente, sendo que o valor de 1,0 é considerado normal.

4. Resultados

No total de 96 amostras de pacientes sem diagnóstico, 89 apresentaram um número de cópias normal nas regiões analisadas pelo painel P297 e sete amostras apresentaram alterações no número de cópias em algumas regiões analisadas. Analisamos ainda três amostras de pacientes já com diagnóstico e em todos confirmamos as alterações, e em dois dos casos foi possível complementar o diagnóstico anterior.

Nos dez casos que apresentaram alterações, quatro são do sexo feminino e seis do sexo masculino, com idades que variam entre os 2 e os 13 anos. As informações clínicas são variadas, sendo as mais comuns défice cognitivo, atrasos no desenvolvimento e dismorfias. As informações referentes a todos os casos com alterações no número de cópias encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações dos dez casos que apresentaram uma alteração no número de cópias no estudo pela técnica de MLPA, usando o painel *SALSA® MLPA® PROBEMIX P297*.

Caso	Género	Idade (anos)	Informações clínicas	Alteração	Região	Genes	Origem
1	F	7	Sem informação	Dup	1q21.1	*CD160, HFE2, PEX11B*	Desconhecida
2	M	13	DC; Obesidade	Del	1q21.1	*PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8*	Mat
3	M	7	DA; AC; Macrossomia; Ligeiras dismorfias inesp.	Del	3q29	*PAK2*	Mat
4	F	6	Irmã c/ dup 3q29	Dup	3q29	*DLG1, PAK2*	Fam
5	M	12	DC sindrómico; Microcefalia; Dismorfias	Del	3q29	*DLG1, PAK2*	Desconhecida
6	F	7	ADPM, Hipotonia, Convulsões	Del	15q13.3	*FAN1, CHRNA7, KLF13, TRPM1*	Mat
7	F	4	Atraso motor ligeiro c/ hiperlaxidez; atraso ligeiro na linguagem; Ligeiras dismorfias faciais inesp.	Del	15q13.3	*FAN1, CHRNA7, KLF13, TRPM1*	*De novo*
8	M	12	ADPM ligeiro; Ligeiras dismorfias inesp.	Del	15q13.3	*FAN1, CHRNA7, KLF13, TRPM1*	Desconhecida
9	M	2	PDI; AC	Del	15q13.3	*FAN1, CHRNA7, KLF13, TRPM1*	Desconhecida
10	M	2	Microcefalia, fácies peculiar não sindrómica	Del	18q21.2	*TCF4*	Desconhecida

Abreviaturas: DC – Défice cognitivo; **DA** – Dificuldades de aprendizagem; **AC** – Alterações comportamentais; **Inesp.** – inespecíficas; **ADPM** – Atrasos no desenvolvimento psicomotor; **PDI** – Perturbações do desenvolvimento intelectual; **Mat** – materno; **Fam** – familiar.

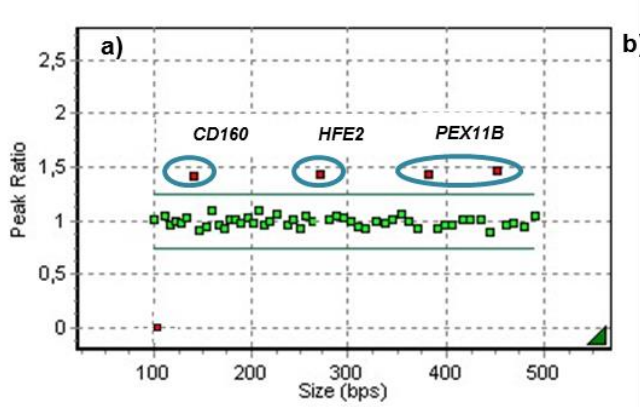
4.1. Banda 1q21.1

Os Casos 1 e 2 apresentaram alterações no número de cópias na banda 1q21.1.

No Caso 1 a alteração envolve os genes associados ao síndrome de TAR, tendo sido detetada uma duplicação em quatro sondas das cinco sondas presentes no painel P297, sendo estas quatro sondas relativas a três genes (Tabela 3). Os três genes envolvidos na duplicação são o *CD160*, o *HFE2* e o *PEX11B*. A proporção dos picos correspondente às sondas dos genes *CD160, HFE2 e PEX11B* apresentaram-se aumentados em aproximadamente 1,4, indicando a presença de três cópias destes genes (Figura 26).

Tabela 3 – Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 1, indicando o painel, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. Em três dos quatro genes rastreados pelo painel P297 para esta região, foi detetada uma alteração no número de cópias, indicando presença de uma duplicação na banda 1q21.1.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias
P297	1q21.1 (Região TAR)	*CD160*	1	3 (Duplicação)
		HFE2	1	3 (Duplicação)
		PEX11B	2	3 (Duplicação)
		PDE4DIP	1	2 (Normal)



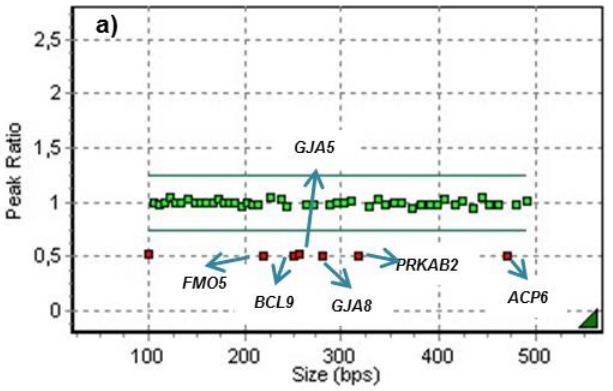
Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	1.000
Y-Frag	105.8	0.000
CD160	140.7	1.419
HFE2	271.8	1.431
PEX11B_a	381.8	1.438
PEX11B_b	452.9	1.468

Figura 26 - Resultado do Caso 1 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram um aumento na proporção do sinal, indicando uma duplicação, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

No Caso 2 a alteração envolve os genes associados ao síndrome de microdeleção/microduplicação 1q21.1 (Tabela 4). Para este síndrome estão presentes seis sondas para seis genes no painel P297 e todas elas apresentaram uma diminuição da proporção do sinal de cerca de 0,5, o que indica a deleção heterozigótica dos genes envolvidos (Figura 27). Os genes envolvidos na deleção são: *PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5* e *GJA8*.

Tabela 4 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 2, indicando o painel, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. Em todos os seis genes rastreados pelo painel P297 para esta região, foi detetada uma diminuição no número de cópias, indicando presença de uma deleção na banda 1q21.1.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias (Caso 2)
P297	1q21.1 (Região distal)	*PRKAB2*	1	1 (Deleção)
		FMO5	1	1 (Deleção)
		BCL9	1	1 (Deleção)
		ACP6	1	1 (Deleção)
		GJA5	1	1 (Deleção)
		GJA8	1	1 (Deleção)



b)

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.530
Y-Frag	105.7	0.991
FMO5	218.5	0.501
BCL9	249.3	0.516
GJA5	255.5	0.522
GJA8	281.6	0.513
PRKAB2	318.5	0.502
ACP6	469.6	0.505

Figura 27 - Resultado do Caso 2 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram uma diminuição na proporção do sinal, indicando uma deleção, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

4.2. Banda 3q29

Neste estudo foram encontrados três casos com alterações nesta banda, os Casos 3, 4 e 5.

No Caso 3 foi detetada uma deleção na banda 3q29 envolvendo o gene *PAK2* (Tabela 5). A proporção do pico correspondente à sonda do gene *PAK2* apresentou-se diminuída em aproximadamente 0,5 (Figura 28).

Tabela 5 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 3, indicando o painel, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. Dos dois genes rastreados pelo painel P297 para esta região, apenas um apresentou uma alteração no número de cópias, indicando presença de uma deleção na banda 3q29.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias
P297	3q29	*DLG1*	1	2 (Normal)
		PAK2	1	1 (Deleção)

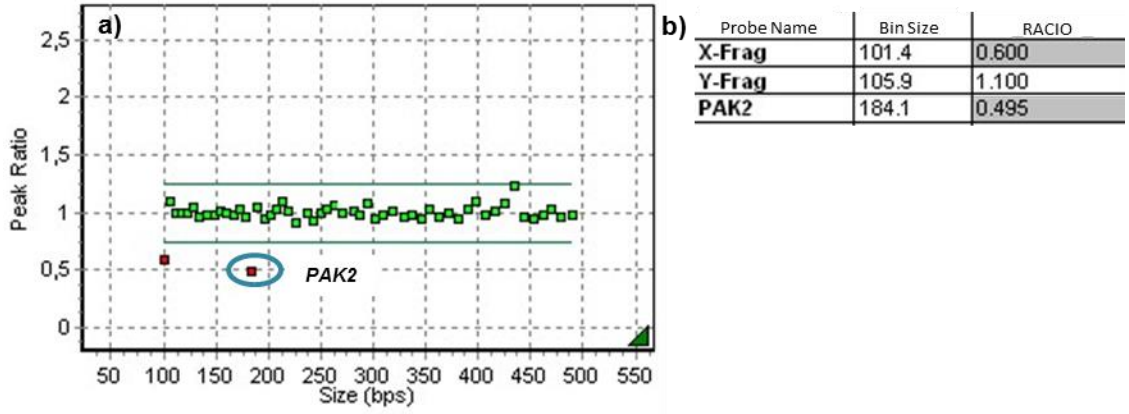


Figura 28 - Resultado do Caso 3 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). A sonda que apresentou uma diminuição na proporção do sinal, indicando uma deleção, encontra-se assinalada e o gene alvo identificado. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

No Caso 4 foi detetada uma duplicação na banda 3q29, que envolve os dois genes estudados no painel P297, o gene *DLG1* e o gene *PAK2*. Este caso já tinha sido estudado anteriormente com o painel P245, tendo sido detetada uma alteração no gene *DLG1*, estando presentes três cópias deste gene (Tabela 6). Para complementar o diagnóstico foi aplicado o painel P297, uma vez que este contém duas sondas para dois genes presentes nesta região, sendo que o painel P245 só apresenta sondas para um gene (*DLG1*). A proporção dos sinais das sondas correspondentes aos genes *DLG1* e *PAK2* apresentaram-se aumentadas em aproximadamente 1,4, indicando a presença de uma microduplicação nesta banda (Figura 29). O resultado obtido com o painel P297 foi concordante e complementou o resultado obtido através do estudo com o painel P245, permitindo verificar que para além do *DLG1*, também o *PAK2* estava envolvido nesta alteração.

Tabela 6 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 4, indicando os painéis, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. No estudo com o painel P245 foi detetada uma alteração nesta banda. Para complementar o caso foi utilizado o painel P297, tendo sido detetada em ambos os genes uma duplicação, concordante com o estudo anterior.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias
P297	3q29	*DLG1*	1	3 (Duplicação)
		PAK2	1	3 (Duplicação)
P245		*DLG1*	2	3 (Duplicação)

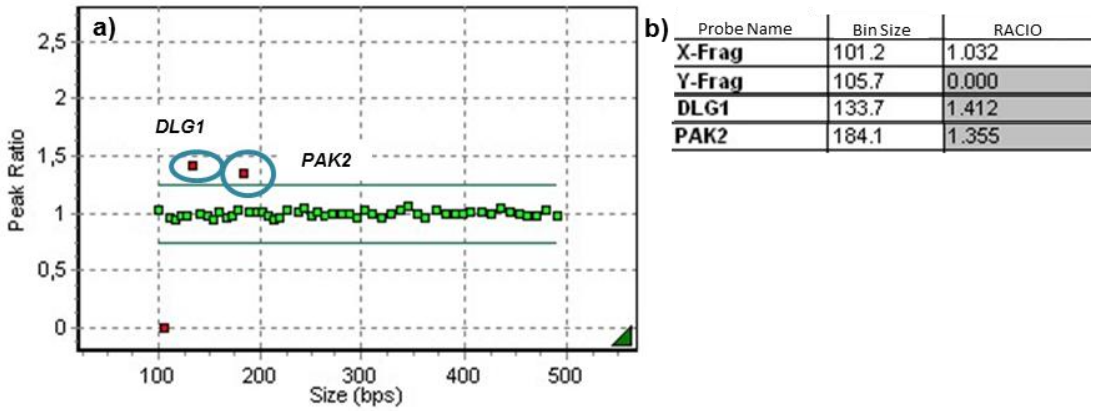
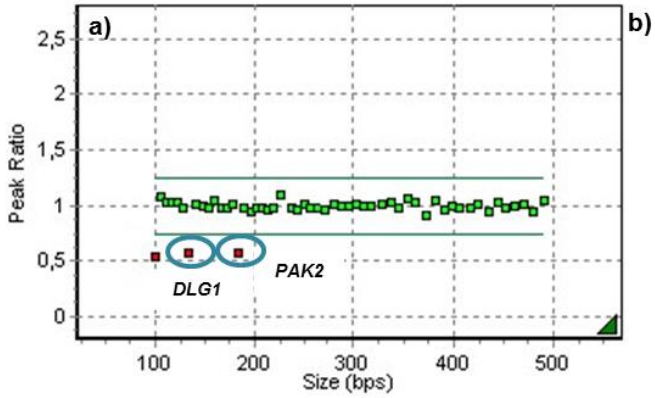


Figura 29 - Resultado do Caso 4 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram um aumento na proporção do sinal, indicando uma duplicação, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

O Caso 5 também já tinha sido anteriormente estudado com o painel P245, tendo sido detetada uma alteração do número de cópias na banda 3q29. A alteração detetada foi uma deleção no gene *DLG1*, tendo este caso sido analisado com o painel P297 para complementar o diagnóstico (Tabela 7). Com o painel P297 foram detetadas diminuições na proporção dos sinais em aproximadamente 0,5 das duas sondas para a banda 3q29, indicando a deleção dos genes *DLG1* e *PAK2* (Figura 30).

Tabela 7 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 5, indicando os painéis, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. No estudo com o painel P245 foi detetada uma alteração nesta banda. Para complementar o caso foi utilizado o painel P297, tendo sido detetada em ambos os genes uma deleção, concordante com o estudo anterior.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nºcópias
P297	3q29	*DLG1*	1	1 (Deleção)
		PAK2	1	1 (Deleção)
P245		*DLG1*	2	1 (Deleção)



Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.537
Y-Frag	105.7	1.079
DLG1	133.7	0.577
PAK2	184.1	0.570

Figura 30 - Resultado do Caso 5 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram uma diminuição na proporção do sinal, indicando uma deleção, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

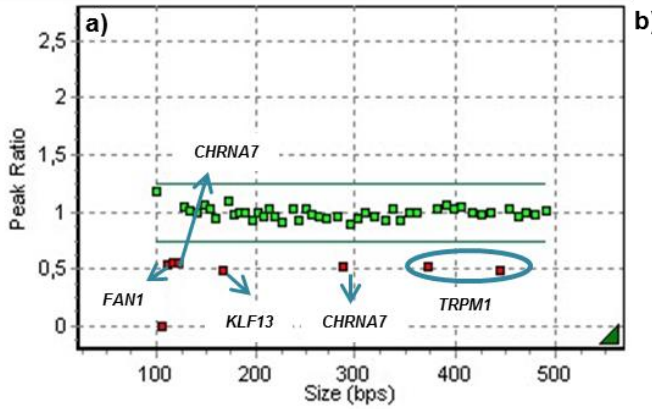
4.3. Região 15q13

Neste estudo foram detetadas alterações no número de cópias na região 15q13 nos Casos 6, 7, 8 e 9.

Nos quatro casos que apresentaram alteração no número de cópias nesta região, foi detetada a mesma alteração, uma deleção envolvendo a banda 15q13.3 (Tabela 8). Sete sondas do painel P297, referentes a quatro genes (*FAN1, TRPM1, KLF13* e *CHRNA7*), apresentaram uma diminuição na proporção do sinal de aproximadamente 0,5, indicando uma microdeleção (Figura 31).

Tabela 8 - Tabela esquemática dos resultados obtidos nos Casos 6, 7, 8 e 9, indicando o painel, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. Em todos os casos, quatro dos seis genes rastreados pelo painel P297 para esta região, foi detetada uma alteração no número de cópias, indicando presença de uma deleção na banda 15q13.3.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias
P297	15q13	*TJP1*	2	2 (Normal)
		FAN1	2	1 (Deleção)
		TRPM1	2	1 (Deleção)
		KLF13	1	1 (Deleção)
		CHRNA7	2	1 (Deleção)
		SCG5	2	2 (Normal)



b)

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.4	1.182
Y-Frag	106.0	0.000
FAN1_a	112.3	0.547
FAN1_b	117.6	0.552
CHRNA7_a	123.3	0.555
KLF13	167.1	0.499
CHRNA7_b	288.1	0.526
TRPM1_a	371.7	0.524
TRPM1_b	444.4	0.494

Figura 31 - Resultado do Caso 7 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®, exemplificando o resultado obtido também para os Casos 6, 8 e 9. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram uma diminuição na proporção do sinal, indicando uma deleção, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

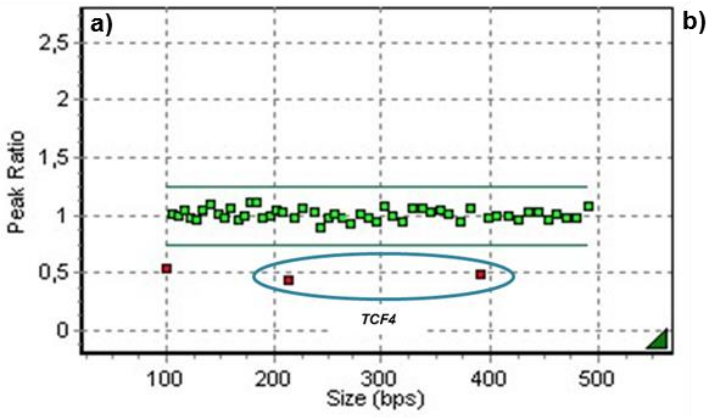
4.4. Banda 18q21.2

Em apenas um caso (Caso 10) foi detetada uma alteração na banda 18q21.2, que se localiza no braço longo do cromossoma 18, envolvendo o gene *TCF4* (Tabela 9). As 2 sondas presentes no painel P297 para o gene *TCF4* apresentaram uma diminuição na proporção do sinal de aproximadamente 0,5, indicando uma deleção nesta região (Figura 32).

O Caso 10 já tinha sido estudado, tendo sido detetada uma deleção nesta banda por *array* e por cariótipo. Foi feita a análise por MLPA para confirmar o diagnóstico e foi usado o painel P297, por ser o único que tinha sondas para o gene *TCF4*. Os resultados obtidos foram concordantes com o diagnóstico anterior.

Tabela 9 - Tabela esquemática dos resultados obtidos no Caso 10, indicando o painel, a região envolvida, os genes alvo das sondas e o número de sondas para cada gene, e o número de cópias presentes para cada gene. O painel P297 rastreia um gene nesta região, o qual apresentou uma alteração no número de cópias, indicando presença de uma deleção na banda 18q21.2.

Painel	Região alvo	Gene alvo	Nº sondas	Nº cópias
P297	18q21.2	*TCF4*	2	1 (Deleção)



b)

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.546
Y-Frag	105.7	1.019
TCF4_a	213.0	0.439
TCF4_b	390.5	0.494

Figura 32 - Resultado do Caso 10 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) No gráfico, do lado esquerdo está indicado a proporção do sinal da sonda e em baixo o tamanho do fragmento em pares de bases (bps). As sondas que apresentaram uma diminuição na proporção do sinal, indicando uma deleção, encontram-se assinaladas e os genes alvo identificados. **b)** Na tabela estão indicadas as sondas, o tamanho do fragmento gerado e a proporção do sinal da sonda.

4.5. Estudos dos progenitores

Foram requisitadas as amostras dos progenitores de todos os casos com alterações, mas apenas chegaram em tempo útil as amostras dos progenitores dos Casos 2, 3, 6 e 7, que foram analisadas com o painel P297, para determinar a origem da alteração. Para os restantes casos a origem das alterações permanece desconhecida até ao momento.

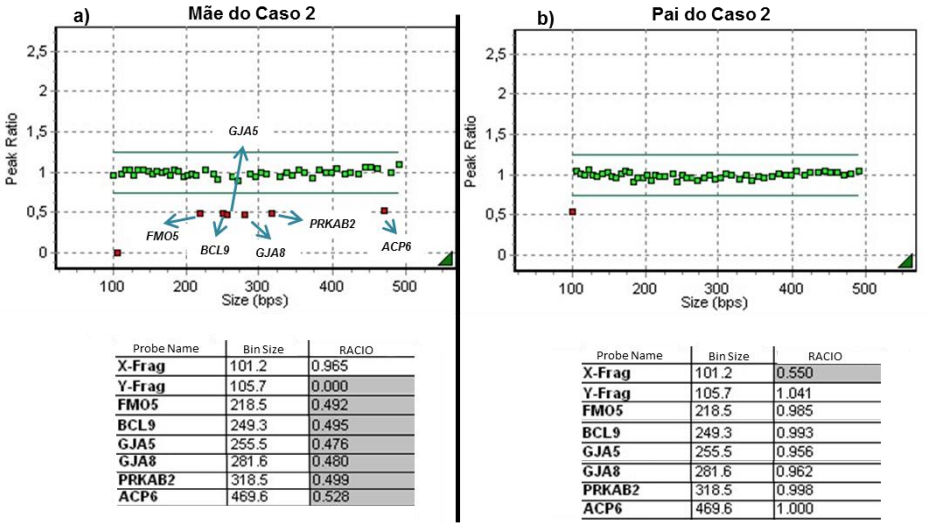
Nos progenitores do Caso 2 concluiu-se que a microdeleção era de origem materna, tendo a mãe apresentado a mesma alteração nos seis genes (*PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5* e *GJA8*) da banda 1q21.1 (Figura 33.a) mas não apresentando alterações fenotípicas. O pai do Caso 2 apresentou um número de cópias normal para todas as regiões analisadas pelo painel P297 (Figura 33.b).

No Caso 3, concluiu-se que a microdeleção presente na banda 3q29, envolvendo o gene *PAK2*, era de origem materna. A mãe apresentava uma redução na proporção do sinal da sonda do gene PAK2 de aproximadamente 0,5, indicando a presença de apenas uma cópia deste gene, concordante com a alteração encontrada no filho (Figura 34.a). A mãe nãoapresentou alterações fenotípicas. O pai não apresentou qualquer alteração nos genes estudados com este painel (Figura 34.b).

Nos progenitores do Caso 6, foi detetada uma deleção na banda 15q13.3 na mãe, envolvendo os mesmo quatro genes (*FAN1, TRPM1, KLF13* e *CHRNA7*) que a filha, sendo a alteração de origem materna (Figura 35.a), não apresentando alterações no fenótipo. O pai do Caso 6 apresentou resultados normais para todas as regiões estudadas pelo painel P297 (Figura 35.b).

Os progenitores do Caso 7 apresentaram ambos resultados normais, concluindo-se que a microdeleção na banda 15q13.3 encontrada na filha será *de novo* (Figura 36).

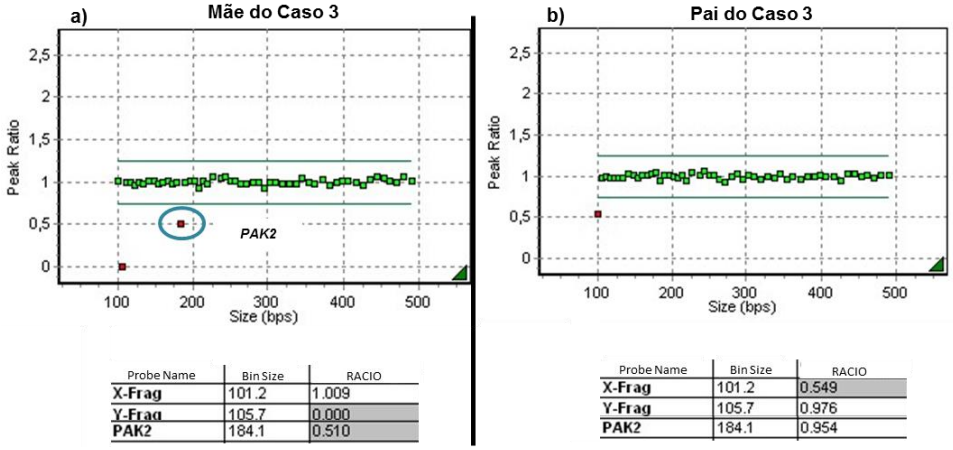
Nos restantes casos não foi possível o estudo dos progenitores, continuando a origem da alteração desconhecida. Contudo, a alteração detetada no Caso 4 é familiar, uma vez a informação clínica presente na requisição de estudo desta doente referia que ela tem uma irmã com duplicação na banda 3q29, tendo sido essa a razão para a análise ser efectuada. No entanto, não foi possível determinar se é de origem materna ou paterna uma vez que as amostras de sangue periférico dos pais ainda não foram disponibilizadas.



Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.965
Y-Frag	105.7	0.000
FMO5	218.5	0.492
BCL9	249.3	0.495
GJA5	255.5	0.476
GJA8	281.6	0.480
PRKAB2	318.5	0.499
ACP6	469.6	0.528

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.550
Y-Frag	105.7	1.041
FMO5	218.5	0.985
BCL9	249.3	0.993
GJA5	255.5	0.956
GJA8	281.6	0.962
PRKAB2	318.5	0.998
ACP6	469.6	1.000

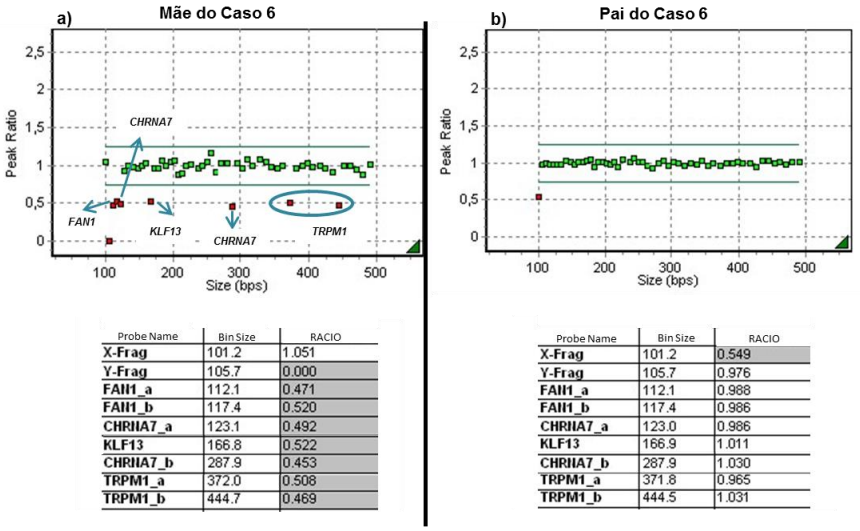
Figura 33 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 2 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) A mãe do Caso 2 apresentou a alteração do número de cópias na mesma banda (1q21.1) e nos mesmos genes que o filho, determinando-se que a alteração tem origem materna. **b)** O pai do Caso 2 apresentou um número normal de cópias para todas as regiões rastreadas pelo painel.



Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	1.009
Y-Frag	105.7	0.000
PAK2	184.1	0.510

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.549
Y-Frag	105.7	0.976
PAK2	184.1	0.954

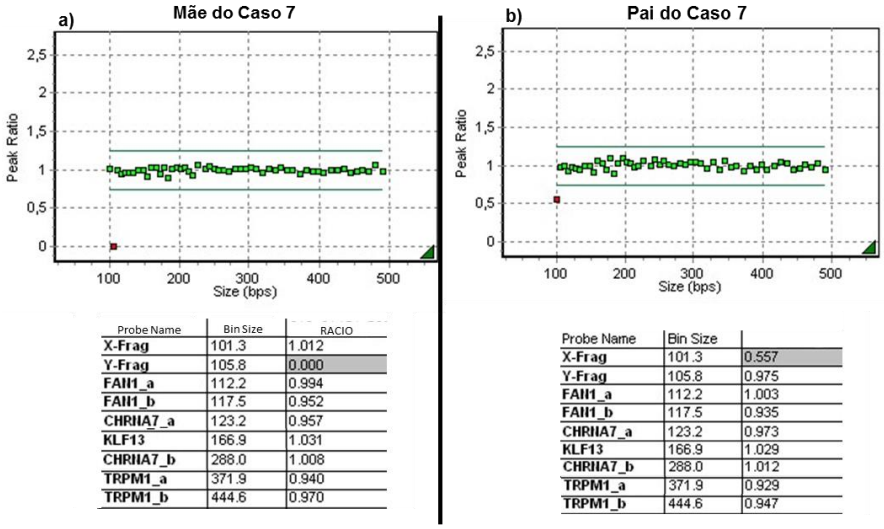
Figura 34 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 3 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) A mãe do Caso 3 apresentou a alteração do número de cópias na mesma banda (3q29) e no mesmo gene que o filho, determinando-se que a alteração tem origem materna. **b)** O pai do Caso 3 apresentou um número normal de cópias para todas as regiões rastreadas pelo painel.



Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	1.051
Y-Frag	105.7	0.000
FAH1_a	112.1	0.471
FAH1_b	117.4	0.520
CHRNA7_a	123.1	0.492
KLF13	166.8	0.522
CHRNA7_b	287.9	0.453
TRPM1_a	372.0	0.508
TRPM1_b	444.7	0.469

Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.2	0.549
Y-Frag	105.7	0.976
FAH1_a	112.1	0.988
FAH1_b	117.4	0.986
CHRNA7_a	123.0	0.986
KLF13	166.9	1.011
CHRNA7_b	287.9	1.030
TRPM1_a	371.8	0.965
TRPM1_b	444.5	1.031

Figura 35 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 6 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. a) A mãe do Caso 6 apresentou a alteração do número de cópias na mesma banda (15q13.3) e nos mesmos genes que a filha, determinando-se que a alteração tem origem materna. **b)** O pai do Caso 6 apresentou um número normal de cópias para todas as regiões rastreadas pelo painel.



Probe Name	Bin Size	RACIO
X-Frag	101.3	1.012
Y-Frag	105.8	0.000
FAH1_a	112.2	0.994
FAH1_b	117.5	0.952
CHRNA7_a	123.2	0.957
KLF13	166.9	1.031
CHRNA7_b	288.0	1.008
TRPM1_a	371.9	0.940
TRPM1_b	444.6	0.970

Probe Name	Bin Size	
X-Frag	101.3	0.557
Y-Frag	105.8	0.975
FAH1_a	112.2	1.003
FAH1_b	117.5	0.935
CHRNA7_a	123.2	0.973
KLF13	166.9	1.029
CHRNA7_b	288.0	1.012
TRPM1_a	371.9	0.929
TRPM1_b	444.6	0.947

Figura 36 - Resultado do estudo dos progenitores do Caso 7 com o painel P297 gerado pelo software *GeneMarker*®. Tanto a mãe (**a)**) como o pai (**b)**) do Caso 7 apresentaram um número de cópias normal para as regiões rastreadas por este painel, determinando-se que a alteração é *de novo*.

4.6. Avaliação do uso do SALSA® *MLPA®* *PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2*

No total de 96 amostras de pacientes sem diagnóstico, 89 apresentaram um número de cópias normal nas regiões analisadas pelo painel SALSA® *MLPA®* *PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2*, e sete amostras apresentaram alterações no número de cópias em algumas das regiões analisadas (7/96). A percentagem de casos sem diagnóstico em que foi possível estabelecer um diagnóstico com o uso do painel P297, foi de 7,3% (Figura 37).

Foram analisadas também três amostras de pacientes já com diagnóstico, para confirmar e complementar o diagnóstico anteriormente feito. Assim, no total de 99 casos analisados com o painel P297, foi possível o rastreio e/ou confirmação do diagnóstico em dez dos 99 casos. Assim, o estudo com o P297 foi útil em 10,10% dos casos (10/99).

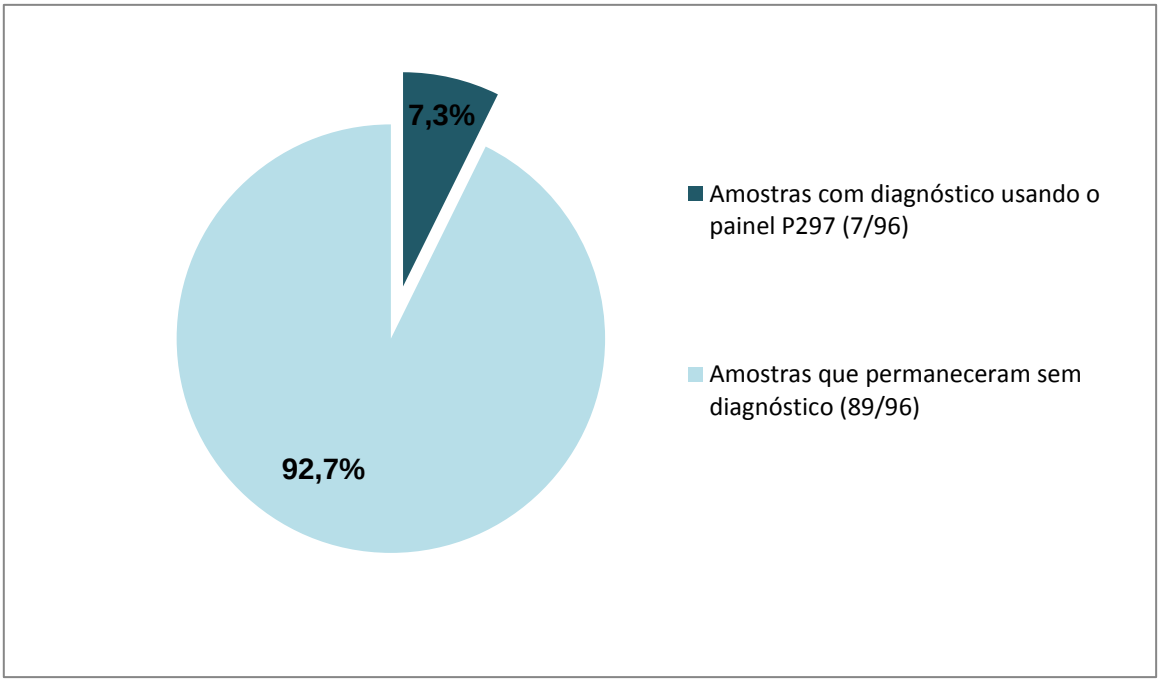


Figura 37 – Gráfico representativo da percentagem de amostras sem diagnóstico que obtiveram resultados com o painel P297 e a percentagem de amostras que permaneceram sem diagnóstico.

5. Discussão de Resultados

5.1. Banda 1q21.1

A deleção na região proximal da banda 1q21.1 está associada ao síndrome de TAR (OMIM #274000) (Klopocki *et al.,* 2007; Theisen e Shaffer, 2010) sendo esta também denominada de região TAR. No entanto, deleções ou duplicações nesta região podem estar associadas a outras consequências fenotípicas que não envolvam o síndrome de TAR (Rosenfeld *et al.,* 2012). Já existem alguns casos descritos de duplicações nesta região, estando associadas a diversas caraterísticas fenotípicas, entre elas: défice intelectual, dismorfias, anomalias cerebrais e da visão, alterações comportamentais e hipotonia (Rosenfeld *et al.,* 2012). Contudo, a associação de alterações nesta região a fenótipos que não o síndrome de TAR continua pouco esclarecida. A informação clínica do Caso 1 é desconhecido, apenas se sabe que a primeira indicação para estudo foi suspeita de síndrome de Sotos, não sendo possível comparar com as caraterísticas fenotípicas que foram associadas a casos descritos com duplicação nesta região.

As deleções na região distal da banda 1q21.1 já estão associadas a um síndrome, o síndrome de microdeleção 1q21.1 (OMIM #612474). Em 2008 foram reportados os primeiros casos associados a este síndrome por Mefford e colaboradores (Mefford *et al.,* 2008), resultantes de uma deleção de cerca de 1,35 Mb tamanho (Mefford *et al.,* 2008; Stefansson *et al.,* 2008) e com um padrão de hereditariedade autossómica dominante (Hamosh, 2008). O fenótipo associado é variável, sendo as caraterísticas fenotípicas mais comuns o défice intelectual e dismorfias (Brunetti-Pierri *et al.,* 2008; Mefford *et al.,* 2008; Theisen e Shaffer, 2010; Rosenfeld *et al.,* 2012; Nevado *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014). Outras alterações fenotípicas associadas incluem microcefalia, anomalias cardíacas congénitas, epilepsia/convulsões, hipotonia, anomalias de visão, perturbações do espetro autista, alterações comportamentais e doenças psiquiátricas (esquizofrenia) (Brunetti-Pierri *et al.,* 2008; Mefford *et al.,* 2008; Stefansson *et al.,* 2008; Theisen e Shaffer, 2010; Rosenfeld *et al.,* 2012; Nevado *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014). O Caso 2 apresenta uma das caraterísticas fenotípicas mais comuns, o défice cognitivo. O fenótipo de obesidade apresentado neste caso não está ainda associado a esta alteração, mas o síndrome apresenta um espetro fenotípico bastante alargado.

5.2. Banda 3q29

Esta banda já está associada a um síndrome de microdeleção/microduplicação, o síndrome de microdeleção/microduplicação 3q29 (OMIM #609425; OMIM #611936). Nos Casos 3 e 5 foi diagnosticado o síndrome de microdeleção 3q29 e no Caso 4 o síndrome de microduplicação 3q29.

O síndrome de microdeleção 3q29 foi descrito pela primeira vez em 2005 por Willat e colaboradores (Willat *et al.*, 2005), e resulta de uma deleção intersticial que envolve, normalmente, 22 genes, entre eles o *DLG1* e o *PAK2* (Willat *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Tyshchenko *et al.*, 2009; Cobb *et al.*, 2010). Estes dois genes são indicados como genes críticos responsáveis pelo fenótipo, sendo homólogos de dois genes do cromossoma X ligados ao défice intelectual (*DLG3* e *PAK3*) (Willat *et al.*, 2005; Tyshchenko *et al.*, 2009; Cobb *et al.*, 2010; Mulle *et al.*, 2010). O padrão de hereditariedade associado a esta microdeleção/microduplicação é autossómico dominante (Mulle *et al.*, 2016). O síndrome apresenta um fenótipo muito variável, sendo as caraterísticas mais comuns o défice intelectual, microcefalia e dismorfias (Ballif *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2014; Mulle *et al.*, 2016). Outras caraterísticas, observadas em vários pacientes incluem doenças psiquiátricas (esquizofrenia, bipolaridade, depressão, ansiedade), perturbações do espetro autista e múltiplas anomalias congénitas (Willat *et al.*, 2005; Mulle *et al.*, 2010; Nevado *et al.*, 2014; Mulle *et al.*, 2016).

Os fenótipos clínicos apresentados pelos pacientes dos Caso 3 e 5 apresentam caraterísticas já descritas em casos anteriores de síndrome de microdeleção 3q29: no Caso 3 temos as dificuldades de aprendizagem (associadas a défice intelectual), alterações de comportamento e dismorfias ligeiras; no Caso 5 temos défice cognitivo, microcefalia e dismorfias. As caraterísticas fenotípicas mais comuns, descritas na literatura, coincidem com as caraterísticas encontradas neste estudo para o síndrome de microdeleção 3q29. No entanto, macrossomia, presente no Caso 3, não se encontra descrita em nenhum dos casos com síndrome de microdeleção 3q29 reportados na literatura, o que pode acontecer nos síndromes de microdeleção/microduplicação por apresentarem fenótipos muito variáveis.

As caraterísticas clínicas do síndrome de microduplicação 3q29 (OMIM #611936) são variáveis, tendo algumas caraterísticas comuns com a microdeleção, sendo que as mais comuns são défice intelectual ligeiro, dismorfias e microcefalia (Ballif *et al.*, 2008; Lisi *et al.,* 2008; Nevado *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014). O Caso 4 apresenta este síndrome, tendo sido detectadas alterações no número de cópias (duplicação) nos dois genes considerados críticos, *DLG1* e *PAK2*, que os painéis P245 e P297 rastreiam. No entanto, não temos

conhecimento das caraterísticas fenotípicas do doente para comparar com as caraterísticas já reportadas. As caraterísticas fenotípicas dos síndromes de microduplicação tendem, no entanto, a ser mais ligeiras que as associadas a síndromes de microdeleção (Ballif *et al.*, 2008).

5.3. Região 15q13

O síndrome de microdeleção 15q13.3 foi descrito em 2008 por Sharp e colaboradores (Sharp *et al.,* 2008), e resulta de uma deleção, com um padrão de hereditariedade autossómico dominante (van Bon *et al.*, 2010). A região crítica da deleção envolve normalmente 7 genes, entre eles os genes *TRPM1, KLF13* e *CHRNA7*, e tem um tamanho de aproximadamente 1,5 Mb (Sharp *et al.,* 2008; Helbig *et al.,* 2009; Shinawi *et al.,* 2009; Theisen e Shaffer, 2010). O gene *CHRNA7* é indicado como o gene crítico responsável pelo fenótipo de epilepsia/convulsões e esquizofrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008; Sharp *et al.,* 2008; Helbig *et al.,* 2009; Shinawi *et al.,* 2009; Nevado *et al.*, 2014), sendo que o painel P297 tem duas sondas para este gene. O síndrome apresenta um fenótipo variável, sendo as caraterísticas mais comuns o défice intelectual, epilepsia/convulsões e dismorfias várias (Sharp *et al.,* 2008; Helbig *et al.,* 2009; Shinawi *et al.,* 2009; Theisen e Shaffer, 2010). Outras caraterísticas fenotípicas associadas a este síndrome incluem perturbações do espetro autista, doenças psiquiátricas (bipolaridade, esquizofrenia, alterações comportamentais) e hipotonia (Stefansson *et al.,* 2008; Helbig *et al.,* 2009; Shinawi *et al.,* 2009; Nevado *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014).

O fenótipo do Caso 6 apresenta uma das caraterísticas mais comuns, associadas a este síndrome, as convulsões e apresenta ainda hipotonia, uma das caraterísticas já reportadas noutros casos. Os Casos 7 e 8 apresentam ligeiras dismorfias, sendo esta uma das caraterísticas mais comuns no síndrome de microdeleção 15q13.3. As caraterísticas clínicas do Caso 9, perturbação do desenvolvimento intelectual (PDI) e alterações comportamentais, já estão associadas a este síndrome, sendo o défice intelectual uma das mais comuns. Uma das caraterísticas fenotípicas, o atraso no desenvolvimento psicomotor (ADPM), foi a mais comum neste estudo para as alterações nesta região, sendo comum nos Casos 6, 7 e 8. Esta caraterística engloba atrasos no desenvolvimento motor, no desenvolvimento intelectual, na linguagem, entre outros, que estão presentes em casos já descritos.

5.4. Banda 18q21.2

A deleção neste gene, localizado no braço longo do cromossoma 18, está associada ao síndrome de Pitt-Hopkins (SPH) (OMIM #610954).

O SPH foi descrito pela primeira vez em 1978 por Pitt e Hopkins (Pitt e Hopkins, 1978). Este síndrome resulta de alterações no gene *TCF4* (Giurgea *et al.,* 2008) e tem um padrão de hereditariedade autossómico dominante (McKusick, 2007). As caraterísticas fenotípicas mais comuns associadas a este síndrome são o défice intelectual, episódios de hiperventilação e dismorfias (Giurgea *et al.,* 2008). Outras caraterísticas associadas a este síndrome incluem baixa estatura, microcefalia, epilepsia e anomalias cerebrais menores (Giurgea *et al.,* 2008). O Caso 10 apresenta microcefalia, sendo esta uma caraterística fenotípica já associada a este síndrome.

5.5. Estudo dos progenitores

Neste estudo foi possível determinar a origem da alteração em cinco casos, sendo que 80% (4/5) alterações são herdadas dos progenitores e 20% (1/5) são *de novo*.

Segundo a literatura, espera-se que este tipo de alterações seja *de novo* (Weise *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2014), devendo-se isto ao facto destas alterações encontradas apresentarem um padrão de hereditariedade autossómico dominante e de se esperar que os portadores da alteração manifestem caraterísticas clínicas. No entanto, todos os progenitores portadores de alteração neste estudo são saudáveis, não tendo sido fornecida qualquer informação clínica contrária pelo médico.

O facto de os filhos expressarem alterações fenotípicas apesar de herdarem a alteração de progenitores que não expressam fenótipo pode ser explicado pela variabilidade expressão e baixa penetrância associadas à mesma microdeleção/microduplicação, bem como a outros fatores, como fatores epigenéticos (Redon *et al.,* 2006; Nevado *et al.*, 2014; Shawky, 2014).

5.6. Avaliação do uso do SALSA® *MLPA®* *PROBEMIX P297 Microdeletion Syndromes-2*

A percentagem de casos que permaneciam sem diagnóstico, nos quais foi possível estabelecer um diagnóstico com o uso do painel P297 foi de 7,3% (7/96). Esta percentagem é bastante valorizada, uma vez que estes casos poderiam ter de recorrer a métodos de rastreio mais caros para descobrir a alteração causadora do fenótipo. Assim, foi possível com o uso deste painel descobrir a etiologia das manifestações clínicas destes doentes, possibilitando um estudo e aconselhamento genético mais direcionado. Apesar de não ser possível, pela técnica de MLPA, aferir o tamanho da deleção/duplicação, esta apresenta-se como um método eficaz para o rastreio primário de síndromes de microdeleção/microduplicação, de modo a desvendar a alteração causadora do fenótipo.

6. Conclusão

Os síndromes de microdeleção/microduplicação têm associados fenótipos variáveis e com caraterísticas sobreponíveis a outros síndromes, isto deve-se à variabilidade de expressão e penetrância que estas alterações apresentam (Redon *et al.,* 2006; Nevado *et al*., 2014, Shawky, 2014), bem como outros fatores. Estes fatores dificultam a associação de caraterísticas fenotípicas a um síndrome específico, dificultando a orientação do clínico para determinada patologia ou síndrome.

Todos os casos estudados neste trabalho apresentaram indicações clínicas sugestivas de presença de síndrome de microdeleção/microduplicação e a maioria não apresentou alterações, tanto no painel P245 como no painel P297. Estes casos poderão apresentar estas caraterísticas devido à presença de alterações noutras regiões cromossómicas que estes painéis não rastreiam ou a rearranjos não detetáveis pela técnica de MLPA.

Os casos analisados neste estudo que apresentaram alterações no número de cópias nas regiões estudadas pelo painel P297 apresentam caraterísticas associadas à alteração rastreada, tendo sido possível a correlação entre o fenótipo apresentado e a alteração detetada. No entanto, a correlação genótipo-fenótipo neste tipo de alterações, como referido anteriormente, é ainda difícil e as indicações clínicas podem ser associadas a variados síndromes. Este facto corrobora a importância de aumentar o número de síndromes e regiões cromossómicas rastreadas, pela técnica de MLPA, para obter uma maior capacidade de diagnosticar doentes com suspeita de síndrome de microdeleção/microduplicação,de modo a que se possa associar genes/sequências particulares com um determinado quadro clínico.

Os síndromes de microdeleção/microduplicação são esperados surgir *de novo* (Weise *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2014), podendo estas surgir de rearranjos em sequências flanqueadas por LCR pelo mecanismo de NAHR, que resulta do crossing over desequilibrado entre LCR (Emanuel e Shaikh, 2001; Korf, 2002; Stankiewicz et al., 2003; Lupski e Stankiewicz, 2005; Lee e Lupski, 2006; Reymond et al., 2007; Gu et al., 2008; Klopocki et al., 2008; Hirschfeldova et al., 2011; Watson et al., 2014). Contudo, há alguns casos de síndromes herdados de progenitores com alteração do número de cópias que não apresentam alterações no fenótipo. Neste estudo a maioria dos casos onde foi possível estudar os progenitores ou ter acesso à informação de familiares, revelou que as alterações foram herdadas. Os progenitores portadores não apresentam caraterísticas fenotípicas alteradas o que se deve à variabilidade de expressão e baixa penetrância destas alterações, podendo estar associados também a outros factores, como factores epigenéticos (Redon *et*

al., 2006; Nevado *et al*., 2014, Shawky, 2014). O estudo dos progenitores permitiu detetar a origem das alterações e, deste modo, é possível um melhor acompanhamento e aconselhamento genético a estas famílias.

O uso deste novo painel (P297) para o rastreio de síndromes de microdeleção/microduplicação, permitiu aumentar o número de casos com diagnóstico. Assim, o uso conjunto do painel P245 e do painel P297 é uma mais-valia na pesquisa destes síndromes de microdeleção/microduplicação, pois aumenta as regiões associadas a microdeleções/microduplicações que são rastreadas, apresentando-se como um método de rastreio bastante útil e com menos custos quando comparado com o aCGH. Para além de um método de rastreio, o uso do painel P297 para confirmar um diagnóstico realizado por outra técnica ou complementar o diagnóstico realizado pelo painel P245, mostrou ser bastante útil.

Conclui-se que o uso dos painéis P245 e P297 no laboratório de Citogenética do CGMJM-CHP é um método vantajoso a adotar para o estudo de síndromes de microdeleção/microduplicação, pois mostrou ser um recurso económico, de fácil realização e uma ferramenta importante no rastreio mais completo destes síndromes.

7. Referências

Ahn, J. W., Ogilvie, C. M., Welch, A., Thomas, H., Madula, R. *et al.* (2007). Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics*, **8**:9.

Ballif, B. C., Hornor, S. A., Jenkins, E., Madan-Khetarpal, S., Surti, U. *et al.* (2007). Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2–p12.2. *Nature Genetics*, **39:**1971-1973.

Ballif, B. C., Theisen, A., Coppinger, J., Gowans, G. C., Hersh, J. H. *et al.* (2008). Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Molecular Cytogenetics,* **1:**8.

Battaglia, A., Novelli, A., Bernardini, L., Igliozzi, R., e Parrini, B. (2009). Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2–p12.2. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **149:**1200-1204.

Boggula, V. R., Shukla, A., Danda, S., Hariharan, S. V., Nampoothiri, S. *et al.* (2014). Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. *Indian Journal of Medical Research*, **139:**66-75

Brunetti-Pierri, N., Berg, J. S., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C. A. *et al.* (2008). Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nature Genetics*, **40:**1466-1471.

Cobb, W., Anderson, A., Turner, C., Hoffman, R. D., Schonberg, S., Levin, S. W. (2010). 1.3 Mb de novo deletion in chromosome band 3q29 associated with normal intelligence in a child. *European Journal of Medical Genetics*, **53:**415-418.

Coffa, J., e van den Berg, J. 2011. Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser. NET by MRC-Holland. 125-150. *In* Modern Approaches To Quality Control. Dr. A. B. Eldin, editor. InTech. DOI: 10.5772/21898.

de Vries, B. B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. A., Vissers, L. E. *et al.* (2005). Diagnostic genome profiling in mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*, **77:**606-616.

Emanuel, B. S., e Shaikh, T. H. (2001). Segmental duplications: na 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nature reviews. Genetics*, ***2*****:** 791-800.

Freeman, J. L., Perry, G. H., Feuk, L., Redon, R., McCarroll, S. A. *et al.* (2006). Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Research*, **16:**949-961.

Friedman, J. I., Vrijenhoek, T., Markx, S., Janssen, I. M., Van Der Vliet, W. A. *et al.* (2008). CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Molecular Psychiatry*, **13:**261-266.

Gardner, R. M., Sutherland, G. R., e Shaffer, L. G. (2011). Chromosome abnormalities and genetic counseling. 4ª edição. Oxford University Press, New York, USA. 978-0-19-537533-6.

Giurgea, I., Missirian, C., Cacciagli, P., Whalen, S., Fredriksen, T., Gaillon, T., Rankin, J., MMathieu-Dramard, M., Morin, G., Martin-Coignard, D., Dubourg, C., Chabrol, B., Arfi, J., Giuliano, F., Lambert, J. C., Philip, N., Sarda, P., Villard, L., Goossens, M., e Moncla, A. (2008). TCF4 Deletions in Pitt-Hopkins Syndrome. *Human Mutation*, **29:**E242-E251.

Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M. E., Oh, E. C., Taniguchi, Y. *et al.* (2012). KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes associated with the 16p11.2 CNV. *Nature*, **485:**363-367.

Gu, W., Zhang, F., e Lupski, J. R. (2008). Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, **1:**4.

Hamosh, A., 2008. Chromosome 1q21.1 Deletion Syndrome, 1.35-MB. 12-12-2008. https://www.omim.org/entry/612474

Helbig, I., Mefford, H. C., Sharp, A. J., Guipponi, M., Fichera, M. *et al.* (2009). 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nature Genetics*, **41:**160-162.

Hempel, M., Rivera Brugués, N., Wagenstaller, J., Lederer, G., Weitensteiner, A. *et al.* (2009). Microdeletion syndrome 16p112-p12. 2: Clinical and molecular characterization. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **149:**2106-2112.

Hills, A., Ahn, J. W., Donaghue, C., Thomas, H., Mann, K., e Ogilvie, C. M. (2010). MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Molecular Cytogenetics*, **3:**19.

Hirschfeldova, K., Baxova, A., Kebrdlova, V., Solc, R., Mihalova, R *et al.* (2011). Cryptic chromosomal rearrangements in children with idiopathic mental retardation in the Czech population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **15:**607-611.

Jankowski, S., Currie-Fraser, E., Xu, L., e Coffa, J. (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis on capillary electrophoresis instruments for a rapid gene copy number study. *Journal of Biomolecular Techniques,* **19:**238-243.

International Schizophrenia Consortium. (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*, **455:**237-241.

ISCN. 2016. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, Switzerland. 978-3-318-05857-4.

Jehee, F. S., Takamori, J. T., Medeiros, P. F. V., Pordeus, A. C. B., Latini, F. R. M., Bertola, D. R. *et al.* (2011). Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, **54:**e425-e432.

Keagle, M. B. 2006. Medical Cytogenetics. 173-188. *In* Molecular Diagnostics for the clinical laboratorian. W.B. Coleman and G.J. Tsongalis, editors. Humana Press, New Jersey.

Khouzani, H. L., Kariminejad, A., Zamani, G., Ghalandary, M., Bozorgmehr, B., Amirsalari, S. *et al.* (2014). Investigation of Microdeletions in Syndromic Intellectual Disability by MLPA in Iranian Population. *Archives of Iranian Medicine*, **17:**471-474.

Klopocki, E., Schulze, H., Strauß, G., Ott, C. E., Hall, J., Trotier, F. *et al.* (2007). Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia–absent radius syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **80:**232-240.

Klopocki, E., Graul-Neumann, L. M., Grieben, U., Tönnies, H., Ropers, H. H. *et al.* (2008). A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *European Journal of Pediatrics*, **167:**903-908.

Korf, B. R. (2002). Genetics and medical practice: new approaches to “old” disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, **14:**688-690.

Kumar, D. (2008). Disorders of the genome architecture: a review. *Genomic Medicine*, **2:**69-76.

Lee, J. A., e Lupski, J. R. (2006). Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron*, **52:**103-121.

Lee, J. A., Carvalho, C. M., e Lupski, J. R. (2007). A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, **131:**1235-1247.

Li, F., Lisi, E. C., Wohler, E. S., Hamosh, A., e Batista, D. A. S. (2009). 3q29 interstitial microdeletion syndrome: an inherited case associated with cardiac defect and normal cognition. *European Journal of Medical Genetics*, **52:**349-352.

Lisi, E. C., Hamosh, A., Doheny, K. F., Squibb, E., Jackson, B., Galczynski, R. *et al.* 2008). 3q29 interstitial microduplication: A new syndrome in a three-generation family. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **146:**601-609.

Lupski, J. R., e Stankiewicz, P. (2005). Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genetics*, **1:**e49.

Lupski, J. R. (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genetics*, **39:**S43-S47.

McKusick, V. A., 2007. Pitt-Hopkins syndrome. 20-01-2007. https://www.omim.org/entry/610954?search=610954&highlight=610954

Mefford, H. C., Clauin, S., Sharp, A. J., Moller, R. S., Ullmann, R., Kapur, R. *et al*. (2007). Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *The American Journal of Human Genetics*, **81:**1057-1069.

Mefford, H. C., Sharp, A. J., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K. *et al.* (2008). Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *New England Journal of Medicine*, **359:**1685-1699.

Mulle, J. G., Dodd, A. F., McGrath, J. A., Wolyniec, P. S., Mitchell, A. A., Shetty, A. C. *et al.* (2010). Microdeletions of 3q29 confer high risk for schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*, **87:**229-236.

Mulle, J. G., Gambello, M. J., Cook, E. H., Rutkowski, T. P., e Glassford, M., 2016. 3q29 Recurrent Deletion. 22-09-2016. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385289/

Nevado, J., Mergener, R., Palomares-Bralo, M., Souza, K. R., Vallespín, E., Mena, R. *et al.* (2014). New microdeletion and microduplication syndromes: a comprehensive review. *Genetics and Molecular Biology,* **37:**210-219.

Pitt, D., e Hopkins, I. (1978). A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. *Australian Paediatric Journal*, **14:**182-184.

Pohovski, L. M., Dumic, K. K., Odak, L., e Barisic, I. (2013). Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Molecular Cytogenetics*, **6:**7.

Ponnuraj, K. T. 2011. Cytogenetic techniques in diagnosing genetic disorders. 45-64. *In* Advances in the Study of Genetic Disorders. Kenji Ikehara, editor. InTech.

Ravnan, J. B., Tepperberg, J. H., Papenhausen, P., Lamb, A. N., Hedrick, J., Eash, D. *et al.* (2006). Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *Journal of medical genetics*, **43:**478-489.

Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D. *et al.* (2006). Global variation in copy number in the human genome. Nature, **444:**444-454.

Regateiro, F. J. 2007. Manual de genética médica. 1ª Edição. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. 972-8704-12-7.

Reymond, A., Henrichsen, C. N., Harewood, L., e Merla, G. (2007). Side effects of genome structural changes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **17:**381-386.

Rodriguez-Revenga, L. R., Mila, M., Rosenberg, C., Lamb, A., e Lee, C. (2007). Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genetics in Medicine*, **9:**600-606.

Rosenfeld, J. A., Traylor, R. N., Schaefer, G. B., McPherson, E. W., Ballif, B. C., Klopocki, E. *et al.* (2012). Proximal microdeletions and microduplications of 1q21.1 contribute to variable abnormal phenotypes. *European Journal of Human Genetics*, **20:**754-761.

Schinzel, A. 2001. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd edition. Walter de Gruyter, Berlin – New York. 3-11-011607-3.

Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., e Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, **30:**e57.

Sellner, L. N., e Taylor, G. R. (2004). MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Human Mutation*, **23:**413-419.

Sharp, A. J., Locke, D. P., McGrath, S. D., Cheng, Z., Bailey, J. A., Vallente, R. U. *et al.* (2005). Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *The American Journal of Human Genetics*, ***77:***78-88.

Sharp, A. J., Selzer, R. R., Veltman, J. A., Gimelli, S., Gimelli, G., Striano, P. *et al.* (2007). Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Human Molecular Genetics*, **16:**567-572.

Sharp, A. J., Mefford, H. C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., Stevenson, R. E. *et al.* (2008). A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nature genetics*, **40:**322-328.

Shaw, C. J., & Lupski, J. R. (2004). Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human molecular genetics*, **13:**R57-R64.

Shawky, R. M. (2014). Reduced penetrance in human inherited disease. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **15:**103-111.

Shinawi, M., Schaaf, C. P., Bhatt, S. S., Xia, Z., Patel, A., Cheung, S. W. *et al.* (2009). A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, **41:**1269-1271.

Shinawi, M., Liu, P., Kang, S. H. L., Shen, J., Belmont, J. W., Scott, D. A. *et al.* (2010). Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics*, **47:**332-341

Shuib, S., Akmal, S. N., Latif, Z. A., Zakaria, Z., Abidin, N. Z. Z., e Zakaria, Z. (2006). The role of conventional and molecular cytogenetics in the diagnosis of microdeletion syndromes. *Medicine & Health*, **1:**45-52.

Stankiewicz, P., Shaw, C. J., Dapper, J. D., Wakui, K., Shaffer, L. G., Withers, M. *et al.* (2003). Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *The American Journal of Human Genetics*, **72:**1101-1116.

Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O. P., Ingason, A., Steinberg, S. *et al.* (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, **455:**232-236.

Stranger, B. E., Forrest, M. S., Dunning, M., Ingle, C. E., Beazley, C., Thorne, N. *et al.* (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, **315:**848-853.

Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., e Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **13:**3245-3276.

Teixeira, R. e Carreira, I. 2005. Meiose e Aneuploidia. 419-428. *In* Biologia Celular e Molecular. C. Azevedo, editors. LIDEL - Edições Técnicas, Lisboa.

Theisen, A., e Shaffer, L. G. (2010). Disorders caused by chromosome abnormalities. *The Application of Clinical Genetics*, **3:**159-174.

Theophilus, B. D., e Rapley, R. 2011. PCR mutation detection protocols. 2nd edition. Springer Science+Business Media, New York, USA. 978-1-60761-946-8.

Tyshchenko, N., Hackmann, K., Gerlach, E. M., Neuhann, T., Schrock, E., e Tinschert, S. (2009). 1.6 Mb deletion in chromosome band 3q29 associated with eye abnormalities. *European Journal of Medical Genetics*, **52:**128-130.

van Bon, B. W. M., Mefford, H. C., e de Vries, B. B. A., 2010. 15q13.3 Microdeletion. 23-12-2010.

Vissers, L. E., de Vries, B. B., Osoegawa, K., Janssen, I. M., Feuth, T., Choy, C. O. *et al.* (2003). Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *The American Journal of Human Genetics*, **73:**1261-1270.

Walters, R. G., Jacquemont, S., Valsesia, A., De Smith, A. J., Martinet, D., Andersson, J. *et al.* (2010). A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature*, **463:**671-675.

Watson, C. T., Masques-Bonet, T., Sharp, A. J., e Mefford, H. C. (2014). The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **15:**215-244.

Weise, A., Mrasek, K., Klein, E., Mulatinho, M., Llerena, J. C., Hardekopf, D. *et al.* (2012). Microdeletion and microduplication syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **60:**346-358.

Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., Fossdal, R., *et al.* (2008). Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *New England Journal of Medicine*, **358:**667-675.

Willatt, L., Cox, J., Barber, J., Cabanas, E. D., Collins, A., Donnai, D. *et al.* (2005). 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **77:**154-160.

Consultas online:

https://www.ensembl.org/index.html (acedido em Outubro de 2017)

https://mlpa.com/ (acedido a Setembro de 2017)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (acedido a Setembro de 2017)

https://www.omim.org/ (acedido em Outubro de 2017)