

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

VARIAÇÕES GENÔMICAS ESTRUTURAIS: MECANISMOS RELACIONADOS À
REARRANJOS CROMOSSÔMICOS

RAFAELLA MERGENER

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

Orientadora: Prof^a Dra. Mariluce Riegel

Porto Alegre
Março de 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e teve como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/476783/2013-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Edital PQG 001/2013).

AGRADECIMENTOS

Dedico essa dissertação:

A minha família:

Ao meu pai José Augusto e a minha mãe Sarai.

A minha irmã Michelle, por ser sempre a primeira a chegar quando eu preciso por sempre estar presente ao meu lado.

As Minhas avós, que sempre tem algo a ensinar.

A Dra. Mariluce Riegel por ter proporcionado esse trabalho, e feito dele algo tão bom e fidedigno.

Ao Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa, pela avaliação clínica dos pacientes, pelos ensinamentos e pela paciência.

As demais, que não serão citadas individualmente, pois são muitas, e estão presentes ou passaram pela minha vida, que deixaram ou ainda deixam coisas boas, sendo agregando conhecimento em toda essa vida acadêmica, trabalho, estágios e salas de aula, ou simplesmente agregando momentos de risos e descontração, que são tão, ou até mais importantes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	8
1.1. Variações genômicas estruturais e rearranjos genômicos	9
1.2. Rearranjos cromossômicas estruturais: deleções e duplicações.....	12
1.2.1. Deleções e Duplicações cromossômicas.....	12
1.3. Origem e formação DE rearranjos cromossômicos.....	15
1.4. Variantes estruturais associadas a doenças genômicas	22
1.5. Investigação Citogenética e suas aplicações no estudo das variações genômicas em humanos	26
1.5.1 Citogenética Clássica.....	26
1.5.2. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	28
1.5.3. Hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (<i>array</i> -CGH)	29
CAPÍTULO 2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
2.1. Justificativa.....	33
2.2. Objetivos	34
2.2.1. Objetivo geral	34
2.2.2. Objetivos específicos	34
CAPÍTULO 3 – ARTIGO – <i>Chromosomal Structural Rearrangements: characterizing interstitial deletions and duplications in the clinical practice</i>	36
CAPÍTULO 4 – Resultados adicionais	62
5.1. Caracterização citogenômica de rearranjos cromossômicos estruturais	63
5.2. Caracterização citogenômica da amostra #1 – del3q11.2-q13.31	65
5.3. Caracterização citogenômica da amostra #2 – del6p24.3-p22.3.....	72
5.4. Caracterização citogenômica da amostra #3 – del18q21.2-q23.....	77
5.5. Caracterização citogenômica da amostra #4 – dup8q24.12-q24.3.....	85
5.6 Caracterização citogenômica da amostra #5– dup18p11.32-p11.21	93

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO	104
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
ANEXOS	128
Anexo I – Registro laboratorial-clínico das amostras armazenadas em repositório de material biológico.....	129
Anexo II – Termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas.....	134
GLOSSÁRIO	135

LISTA DE ABREVIATURAS

% –	Por cento
~ –	Aproximadamente
> –	Maior
≥ –	Maior ou igual
A –	Adenina
AHR –	Recombinação homóloga alélica (<i>Allelic Homologous Recombination</i>)
Array-CGH –	Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (<i>Microarray-based Comparative Genomic Hybridisation</i>)
BIR –	Replicação induzida por quebra (<i>Break-Induced Replication</i>)
C –	Citosina
CCR –	Rearranjos Cromossômicos Complexos (<i>Complex Chromosome Rearrangements</i>)
CGH –	Hibridização Genômica Comparativa (<i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
ClinGen –	<i>Clinical Genetics Resource</i>
CMT1A –	<i>Charcot-Marie-Tooth disease tipe 1A</i>
CNPs –	Polimorfismos do número de cópias (<i>Copy Number Polymorphisms</i>)
CNVs –	Variação do número de cópias (<i>Copy Number Variation</i>)
Cy3 –	<i>Cyanine dye 3</i>
Cy5 –	<i>Cyanine dye 5</i>
dCTPs –	desoxiCitidina Trifosfatada
DECIPHER –	<i>DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
del –	deleção
DGV –	<i>Database of Genomic Variants</i>
dn –	<i>de novo</i>
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PKcs –	<i>DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit</i>
DSB –	Quebras de dupla fita de DNA (<i>Double Strand Break</i>)
DSBR –	Reparo de quebra de fita dupla (<i>Double-Strand Break Repair</i>)
dup –	duplicação
ECARUCA –	<i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations</i>
ETs –	Elementos Transponíveis
FISH –	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência (<i>Fluorescence In situ Hybridization</i>)
FoSTeS –	Colapso de forquilha com desvio do modelo (<i>Fork Stalling and Template Switching</i>)
G –	Guanina
G2 –	<i>Gap2</i> phase
GeCCO –	<i>Genomic CNV Classification Objectively</i>

HCPA –	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV –	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HJ –	Junções de Holliday (<i>Holliday Junctions</i>)
HRR –	Reparo por recombinação homóloga (<i>Homologous Recombination Repair</i>)
i.e. –	<i>id est</i>
inv –	inversão
ITs –	Telômeros Intersticiais (<i>Interstitial Telomeres</i>)
Kb –	Quilobases
LCR –	Baixo número de cópias (<i>Low Copy Repeats</i>)
Lines –	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
LOH –	Perda de heterozigosidade (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LTRs –	<i>Long terminal repeats</i>
Mb –	Megabase
MCA –	Anomalias Congênitas Múltiplas (<i>Multiple Congenital Abnormalities</i>)
MECP2 –	<i>MEthil-CpG-binding Protein 2</i>
MEPS –	Segmentos mínimos de processamento (<i>Minimal Efficient Processing Segments</i>)
mFISH –	<i>multicolor FISH</i>
MMBIR –	Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication</i>)
MMEJ –	União das extremidades mediada por microhomologia (<i>Microhomology-Mediated End Joining</i>)
NAHR –	Recombinação homóloga não alélica (<i>Nonallelic Homologous Recombination</i>)
NHEJ –	União de extremidades não homólogas (<i>Non-Homologous End-Joining</i>)
nts –	nucleotídeos
OMIM –	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR-gene –	<i>Olfactory Receptor–Gene</i>
p –	Braço curto
pb –	pares de base
PCR –	Reação em cadeia da polymerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLP1 –	<i>ProteoLipid Protein 1</i>
PMP22 –	<i>Peripheral Myelin Protein 22</i>
q –	Braço longo
RAI1 –	<i>Retinoic Acid-Induced gene 1</i>
ROS –	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPM –	Rotações por minuto
S –	Fase S (<i>Synthesis phase</i>)
SDSA –	Ligação dependente da síntese da cadeia de DNA (<i>Synthesis-Dependent Strand Annealing</i>)
SINEs –	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>

SKY –	Cariótipo espectral (<i>Spectral Karyotyping</i>)
SNP –	Polimorfismo de base única (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPO11 –	<i>Sporulation-specific protein 11</i>
SRO –	Região de sobreposição comum (<i>Smallest Region of Overlap</i>)
SRS –	Derrapagem em série da replicação (<i>Serial Replication Slippage</i>)
SSA –	Emparelhamento de fita simples (<i>Single-Strand Annealing</i>)
ssDNA –	Cadeia simples de DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
SVs –	Variantes estruturais (<i>Structural Variation</i>)
T –	Timina
V(D)J –	<i>Variable, Diversity and Joining</i>
VOUS –	Variante de significado incerto (<i>Variant Of Unknown Significance</i>)
XPF –	Grupo de complementação F de xeroderma pigmentoso (<i>Xeroderma Pigmentosum complementation group F</i>)

RESUMO

Rearranjos cromossômicos estruturais são uma parte normal da variação no genoma humano, mas algumas classes de rearranjos podem causar síndromes de malformações e/ou deficiência intelectual. Rearranjos estruturais surgem em células pré-meióticas, meióticas, ou pós-zigóticas e, na maioria dos casos, o tempo da sua formação é desconhecido. A abordagem clássica de formação de um rearranjo estrutural propõe a ocorrência aleatória de pontos de quebra, com a união das pontas quebradas. No entanto, tem sido sugerida a existência de segmentos cromossômicos que são mais suscetíveis à formação de rearranjos do genoma. Esta distribuição não-aleatória de pontos de quebra pode ser um reflexo de características moleculares estruturais, com atributos específicos do DNA ou cromatina em certos segmentos cromossômicos, levando-os à reorganização genômica. Este trabalho aborda a caracterização de cinco tipos diferentes de deleções (3q11.2q13.31; 6p24.3p22.3 e 18q21.2q23) e duplicações (8q24.13q24.3 e 18p11.32p11.21) cromossômicas. Também explora os mecanismos moleculares de suas formações. Os métodos aplicados incluíram bandamento cromossômico, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), e hibridação genômica comparativa baseada em microarranjo (*array*-CGH). A determinação de pontos de quebra cromossômicos revelou os caminhos para a formação dos rearranjos recorrentes e não recorrentes e permitiu reconhecer quais genes foram interrompidos, fundidos, e/ou, eventualmente, desregulados por cada variação estrutural. As características estruturais e arquitetonômicas dos segmentos rearranjados mostraram tipos distintos de variações estruturais e mecanismos distintos de origem, levando a doenças causadas por rearranjos, sendo duas *de novo* (del6p24.3p22.3 e inv del18q21.2q23) e duas herdadas (del3q11.2q13.31 e invdup8q24.13q24.3). Nossos dados sugerem que, quando avaliados com métodos citogenômicos suficientemente sensíveis, uma identificação correta das regiões críticas é viável e leva a uma maior compreensão dos efeitos de rearranjos cromossômicos presentes em indivíduos com fenótipos clinicamente relevantes. Estes dados também contribuem para a compreensão das características, funcionalidades, e plasticidade do nosso genoma. Juntos, estes dados trazem informações importantes para uma melhor compreensão sobre os fatores de risco para a formação de deleções e duplicações genômicas, sobre a origem dos rearranjos cromossômicos e sobre os principais genes responsáveis por determinadas malformações congênitas.

ABSTRACT

Chromosomal structural rearrangements are a normal part of variation in the human genome, but some classes of rearrangements can cause malformation syndromes and/or intellectual disabilities. Structural Rearrangements arises in premeiotic, meiotic, or postzygotic cells, and in most cases the timing of its formation is not known. The classical approach of forming structural rearrangement proposes the random occurrence of breakpoints, with the junction of the broken ends. However, it has been suggested the existence of chromosomal segments which are most susceptible to the formation of the genome rearrangements. This non-random distribution of breakpoints may be a reflect of the molecular structure characteristics with specific attributes in DNA or chromatin in certain chromosome segments, taking these to a genomic reorganization. This work covers the characterization of five different types of chromosomal deletions (3q11.2q13.31; 6p24.3p22.3 and 18q21.2q23) and duplications (8q24.13q24.3 and 18p11.32p11.21). It also explores the molecular mechanisms of its formation. The methods applied included chromosome banding, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and array comparative genome hybridization (array-CGH). Chromosome breakpoint determination revealed pathways to recurrent and non-recurrent chromosome rearrangements and allowed to recognize which genes were disrupted, fused, and/or possibly misregulated by each structural variation. The structural and architectural features of the rearranged segments showed distinct types of structural variations and distinct mechanisms of origin, leading to 2 *de novo* (del6p24.3p22.3 and inv del18q21.2q23) and 2 inherited (del3q11.2q13.31 and invdup8q24.13q24.3) disease causing rearrangements. Our data suggest that, when assessed with sufficiently sensitive cytogenomic methods, a reliable identification of structural variation regions is feasible and leads to a greater understanding of the effects of chromosome rearrangements present in individuals with clinically relevant phenotypes. This data also contributes to the understanding of the characteristics, features, and plasticity of our genome. Together, this data points to risk factors for genomic deletions and duplications formation, to the origin of chromosome rearrangements and to key genes responsible for congenital malformations.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1.1. VARIAÇÕES GENÔMICAS ESTRUTURAIS E REARRANJOS GENÔMICOS

As variações no genoma humano podem assumir várias formas, desde alterações cromossômicas visíveis microscopicamente até alterações num único nucleotídeo. Essas variações contribuem para a variabilidade genética humana e o seu tamanho pode variar entre kilobases (Kb) e megabases (Mb) (Redon *et al.*, 2006). As variações no número de cópias (CNVs – *Copy Number Variation*) são definidas como segmentos de DNA de tamanho igual ou superior a 1Kb que apresentam um número de cópias variável em relação a um genoma de referência, incluindo deleções, duplicações ou inserções. As CNVs que ocorrem em mais de 1% da população são também designadas por polimorfismos do número de cópias (CNPs – *Copy Number Polymorphisms*) e aquelas com tamanho igual ou superior a 50Kb são conhecidas como CNVs de larga escala (Feuk *et al.*, 2006).

O termo rearranjo genômico ou cromossômico é utilizado para definir grandes mudanças no DNA de milhares a alguns milhões de pares de base, que afetam conjuntos de diferentes genes. Os rearranjos genômicos são diferentes das mutações de ponto não apenas pelo tamanho, mas também pelo mecanismo de formação e efeito patogênico em relação ao fenótipo (Gu *et al.*, 2008).

Rearranjos genômicos, exceto em processos imunológicos, foram inicialmente considerados como eventos aleatórios que levariam a uma seleção evolutiva. Entretanto, tornou-se evidente que estes são influenciados pelo tipo de célula, estágio do ciclo celular e contexto genômico, podendo ser desencadeado por estímulos ambientais ou celulares (Mani & Chinnaiyan, 2010). Para que estes rearranjos sejam desencadeados, alguns fatores são fundamentais, como por exemplo, a estreita proximidade espacial, o estado aberto da cromatina e a pausa na replicação ou quebra na cadeia de DNA (Fig. 1.1).

A proximidade entre *loci* pode ser induzida por vias de sinalização ou pode ser específico para cada tipo celular. Os genes são ativos de forma dinâmica e organizada em subcompartimentos nucleares partilhados, referidos como “fábricas”, as quais representam locais distintos que parecem estar aleatoriamente dispersos por todo o volume nuclear. O volume nuclear abriga os fatores necessários para desempenhar funções de transcrição, replicação e reparo de quebras contribuindo para que ocorram os rearranjos genômicos. As ações de fatores de transcrição em linhagens específicas poderiam, pelo menos em parte, explicar a especificidade celular de rearranjos genômicos somáticos (Ji *et al.*, 2000; Misteli, 2007; Mani & Chinnaiyan, 2010).

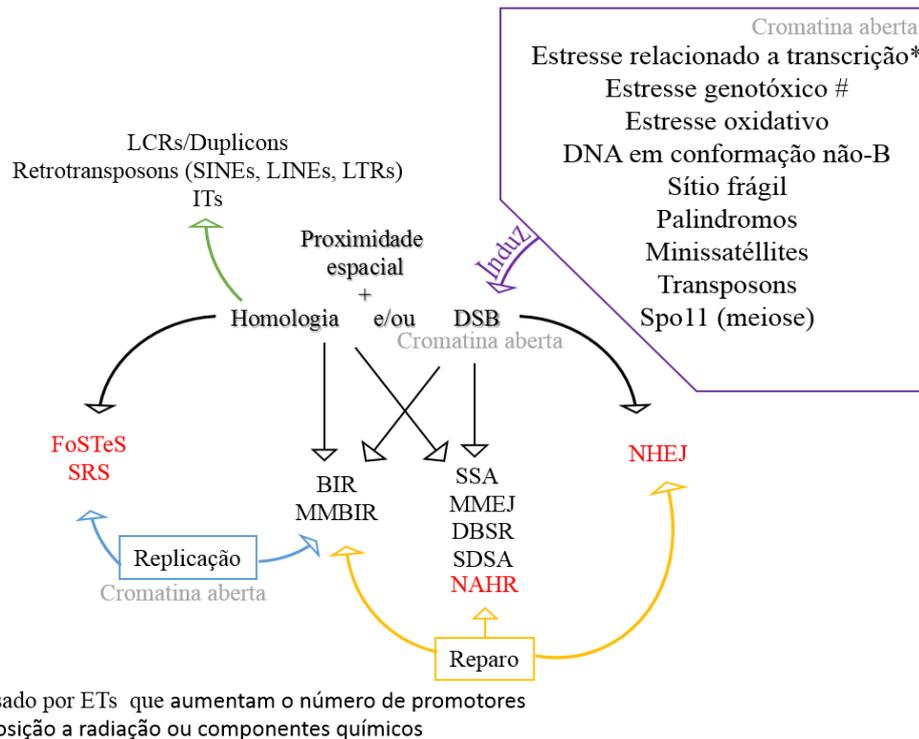


Figura 1.1: Resumo esquemático mostrando os constituintes que contribuem para desencadear processos de rearranjos cromossômicos. Estes dependem basicamente de um estado aberto da cromatina, favorecido pela transcrição, replicação ou quebra de dupla fita de DNA; seguido da proximidade espacial das sequências afetadas que devem possuir um certo grau de homologia. Sequências que são semelhantes e dispersas pelo genoma, como LCRs (*Low copy repeats*), retrotransposons (Lines – *Long interspersed nuclear element*; SINEs – *Short Interspersed Nuclear Elements* e LTRs – *Long terminal repeats*) proporcionam esta homologia. As quebras de dupla fita de DNA resultam de conformações de DNA mais propícias a dano (DNA em conformação não-B, Sítio frágil, Palíndromos, Minissatélites), estresse na replicação causados por ETs (Elementos transponíveis) ou por meio de um mecanismo endógeno de quebra programada (SPO11 – *Sporulation-specific protein 11*). BIR, MMBIR, SSA, MMEJ, DSBR e SDSA correspondem aos mecanismos de recombinação homóloga que em caso de um pareamento equivocado, resultarão em um dos três principais mecanismos de origem; NAHR (*Nonallelic Homologous Recombination*). NHEJ (*Nonhomologous DNA end joining*) ou FoSTes (*Fork Stalling and Template Switching / SRS - Serial Replication Slippage*).

Em ambos processos de replicação e reparo de quebras do DNA a cromatina encontra-se em um estado aberto. A recombinação meiótica envolvendo quebras de dupla fita de DNA (DSB – *Double Strand Break*) é de 100 a 1.000 vezes mais frequente que a mitótica, assegurando as trocas físicas entre cromossomos homólogos e promovendo assim a diversidade genética. Este processo é induzido pela Spo 11 (*Sporulation-specific protein 11*) que estimula DSBs no início da prófase I na meiose I. A distribuição da recombinação meiótica em genomas desde leveduras a mamíferos não é aleatória, sendo que a maioria das recombinações ocorrem em domínios genômicos de 1-2 Kb denominados *hotspots* (Moore & Shaw, 2009; Sasaki *et al.*, 2010; Genois *et al.*, 2014). Elementos transponíveis (ETs) também podem induzir a formação de rearranjos genômicos. Esta indução pode ser indireta, por meio de excisão que gera DSBs,

ou direta, por um processo de transposição alternativa onde as extremidades envolvidas pertencem a ETs distintos (Gray, 2000; Currall *et al.*, 2013).

Nem todas as sequências de DNA são iguais em sua contribuição para a integridade genômica, sendo que algumas são mais propensas a quebras, como sequências em conformações estruturais que induzem instabilidade genética em vez de adotar o padrão Watson-Crick de dupla hélice (estrutura-B). Estas adotam estruturas de DNA não-B, pelo menos transitoriamente, as quais incluem Z-DNA, DNA cruciforme, H-DNA (tríplice), e tetrâmeros de DNA. Os sítios frágeis são tipicamente ricos em AT ou abrigam repetições de CGG o que os torna altamente predispostos a quebras, especialmente sob condições de estresse de replicação. (Wells, 2007; Mani & Chinnaiyan, 2010; Currall *et al.*, 2013).

Devido à constante exposição ao estresse celular, estima-se que ocorram dez quebras de cadeia dupla por célula a cada dia. Estas são normalmente corrigidas eficientemente por vários mecanismos elaborados de resposta e reparação a danos no DNA. Uma falha no mecanismo de reparo resulta em rearranjos genômicos induzindo a formação de rearranjos cromossômicos estruturais complexos (Mani & Chinnaiyan, 2010).

1.2 REARRANJOS CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS: DELEÇÕES E DUPLICAÇÕES

Estudos clássicos em citogenética observaram que as anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais estão presentes em cerca de 1% amostras não selecionadas de recém-nascidos (Jacobs *et al.*, 1992) e em mais de 10% dos natimortos (Jackson, 2002). Rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais podem estar presentes em todas as células de um indivíduo, bem como podem abranger apenas uma porção delas, sendo, neste caso, denominado mosaïcismo. Estima-se que, aproximadamente, 6% das crianças nascidas com malformações congênitas, incluindo nativos e natimortos, apresentem desequilíbrios cromossômicos (Nelson & Holmes, 1989; Le Caignec *et al.*, 2005; Korteweg *et al.*, 2008). Destes, cerca de 80% são trissomias dos cromossomos 13, 18 ou 21. As alterações cromossômicas mais frequentes são as numéricas, e em cerca de 40% dos casos ocorrem alterações estruturais do genoma (Jackson *et al.*, 2002). Rearranjos cromossômicos estruturais são decorrentes de quebras em diferentes segmentos e reparo das extremidades quebradas de forma incorreta. Esta falha no mecanismo de reparo pode ocasionar deleções e/ou duplicações cromossômicas resultando em monossomias e/ou trissomias parciais ao longo do genoma (Fig. 1.2).

1.2.1. DELEÇÕES E DUPLICAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A deleção envolve perda(s) de sequência(s) de DNA de um segmento cromossômico, resultando em uma monossomia parcial que resultará em haploinsuficiência de um ou mais genes. As consequências clínicas da deleção dependerá do tamanho do segmento afetado e da função dos genes localizados na sequência perdida.

As deleções de segmentos cromossômicos detectadas ao microscópio têm uma incidência aproximada de 1:7000 nascidos vivos (Jones, 2006), podendo ser terminais, quando as quebras ocorrem na porção final das extremidades cromossômicas, ou intersticiais, se ocorrerem entre o centrômero e uma das extremidades. Deleções de segmentos distais são mais frequentes e ocorrem predominantemente em alguns segmentos cromossômicos com maior frequência do que em outros. Esta frequência maior observada em algumas regiões cromossômicas pode refletir a viabilidade de uma monossomia para determinadas sequências ou delinear regiões do genoma que possuem características estruturais mais propensas a rearranjos cromossômicos (Shaffer & Lupski, 2000).

A duplicação ocorre quando uma mesma sequência do genoma se repete gerando uma ou mais cópias de um determinado segmento cromossômico. As duplicações podem ser diretas,

com o segmento duplicado apresentando a sequência de DNA no mesmo sentido da sequência original ou invertidas, com este em sentido oposto.

Análise de longas extensões de sequências disponíveis a partir dos cromossomos humanos 22 e X sugerem que 5% -10% do genoma possa ser duplicado. Um total de 1,1 Mb da sequência genômica, abrangendo 21 genes diferentes já identificados, mostram homologia de sequências (95% -98%). Estas duplicações segmentares ou *duplicons*, também conhecidos como repetições de baixo número de cópias (LCR – *Low Copy Repeat*), consistem geralmente de blocos de DNA de aproximadamente 10-400 Kb com $\geq 90\%$ de identidade, distribuídos em regiões intercromossômicas ou intracromossômicas. Sequências extensas de *duplicons* com alta identidade podem ser necessárias para iniciar o emparelhamento e/ou estabilizar o complexo de recombinação, por *crossing-over* desigual. (Eichler, 1998; Lupski, 1998; Ji *et al.*, 2000; Stankiewicz & Lupski, 2002; Goidts *et al.*, 2006; Sibbons *et al.*, 2012; Currall *et al.*, 2013; Pratto *et al.*, 2014).

Duplicações intracromossômicas são mais frequentes do que as duplicações intercromossômicas, com o grau de duplicação segmentar variando 1-14% entre os 24 cromossomos humanos. Sendo que as frequências de duplicações em regiões pericentroméricas e subteloméricas são de três a quatro vezes maiores do que a média do genoma nos cromossomos humanos, respectivamente. Tais regiões abrigam grandes extensões (50-200 Kb) de segmentos genômicos duplicados que apresentam um notável grau de similaridade entre as sequências (95%-99%), fazendo com que a dinâmica da duplicação por transposição seja significativamente maior nestas regiões em comparação com a média do genoma (Eichler, 1998; Ji *et al.*, 2000; Stankiewicz & Lupski, 2002; Goidts *et al.*, 2006; Sudmant *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2015).

Alguns mecanismos têm sido descritos associados à formação de variações estruturais no genoma durante o processo de divisão celular. Estas variações podem induzir rearranjos cromossômicos resultando em deleções e/ou duplicações patogênicas. São propostos três mecanismos principais para explicar a formação de rearranjos cromossômicos estruturais: a recombinação homóloga não alélica (NAHR – *Non-Allelic Homologous Recombination*), para quando existir recombinação entre regiões flangeadoras repetitivas; a união de extremidades não homólogas (NHEJ – *Non-Homologous End Joining*) para quando simplesmente as cadeias duplas de DNA que sofreram uma quebra se unem e; o colapso de forquilha com desvio do modelo (FoSTes - *Fork Stalling and Template Switching*), o qual ocorre durante a replicação do DNA, a partir de uma interrupção em uma região de difícil replicação ocasionando o deslizamento da replicação para uma cadeia de DNA complementar. Esses rearranjos

desencadeiam quadros clínicos em função da modificação da dosagem gênica dentro da região crítica de ruptura. Além disso, fenótipos alterados podem ocorrer em decorrência da ruptura de regiões codificadoras ou de regiões regulatórias contíguas a região de deslizamento (Gu *et al.*, 2008; Conrad *et al.*, 2010; Stankiewicz & Lupski, 2010; Arlt *et al.*, 2012).

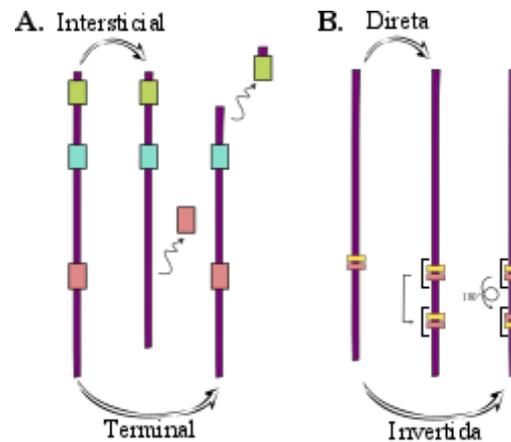


Figura 1.2: Esquema demonstrativo do padrão encontrado em: (A) deleção intersticial e terminal; (B) duplicação direta e invertida, ambas em relação ao primeiro cromossomo esquematizado.

1.3. ORIGEM E FORMAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS

Rearranjos genômicos causadores de doenças podem ser recorrentes ou não recorrentes. Os rearranjos recorrentes incluem o mesmo intervalo genômico, com tamanho comum e pontos de quebra fixos, e ocorrem em indivíduos não aparentados. Os rearranjos não-recorrentes possuem diferentes tamanhos e pontos de quebra distintos para cada evento. (Gu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Vissers *et al.*, 2012). Os rearranjos genômicos que causam danos ao DNA provocam a ativação de processos de reparo controlados geneticamente. As células normais são capazes de reparar danos corretamente ou de introduzir erros durante o reparo, de acordo com o tipo de lesão e do mecanismo utilizado para o reparo.

NAHR foi o primeiro mecanismo de rearranjo de DNA identificado como causador de distúrbios genômicos. Ocorre durante a meiose e a mitose e requer LCRs com comprimento suficiente e de homologia elevada, ou seja, ambas têm de conter segmentos mínimos de processamento (MEPS – *Minimal Efficient Processing Segments*) para atuarem como substratos de recombinação. Para que ocorra uma recombinação homóloga meiótica eficiente é necessário que os MEPS sejam entre 337 e 456 pb de comprimento. LCRs com mais de 10 Kb em tamanho e com 95% a 97% de identidade na sequência de DNA resulta em NAHR intersticial mediando rearranjos recorrentes (Ji *et al.*, 2000; Stankiewicz & Lupski, 2002; Gu *et al.*, 2008; Ou *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). O emparelhamento vinculado a NAHR resulta em uma sinapse defeituosa entre sequências não alélicas, ou sinapses ectópicas. Um modelo de previsão da sinapse ectópica são mutações em proteínas necessárias para esta, que podem afetar as taxas de *crossing-over* ou NAHR. (Liu *et al.*, 2012).

Estruturas de DNA capazes de induzir DSBs (como palíndromos, DNA conformação não-B, minissatélites e transposon) foram frequentemente encontrados perto de *hotspots* de NAHR, indicando uma potencial ligação entre NAHR e DSBs (Moustachi, 2000; Goidts *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2008; Stankiewicz & Lupski, 2010; Ou *et al.*, 2011; Currall *et al.*, 2013).

Rearranjos não recorrentes são causados por NHEJ, que é um dos dois principais mecanismos utilizados por células eucarióticas para reparar DSB, e tem sido descrito em organismos desde bactérias até mamíferos, onde é rotineiramente utilizada pelas células humanas para reparar tanto DSBs fisiológicas, como acontece em recombinações V(D)J (geração de diversidade dos anticorpos), quanto quebras patológicas, tais como as causadas por espécies reativas de oxigênio ou radiação ionizante (Gu *et al.*, 2008).

Este mecanismo é caracterizado pela ausência de LCRs que flanqueiam os pontos de ruptura e, muitas vezes deixa uma “cicatriz de informação” ou microhomologia no local da

união. Esta cicatriz inclui clivagem ou adição de vários nucleotídeos, geralmente de origem desconhecida (Fig. 1.3).

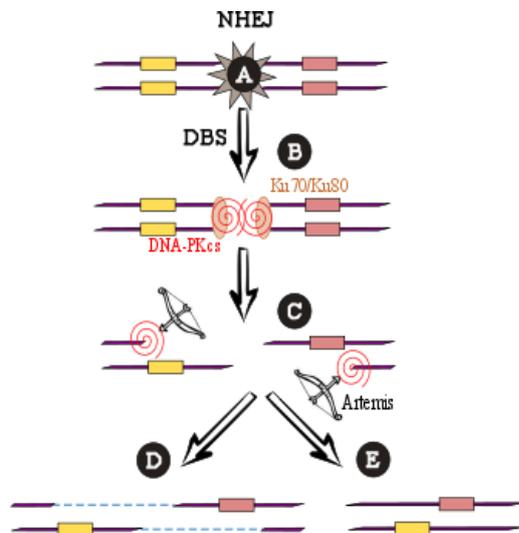


Figura 1.3: União de extremidades não homólogas NHEJ. (A) DSBs, (B) detecção da DSB pelo heterodímero *Ku70/Ku80*, de um modo que independe a sequência e recruta a *DNA-PKcs* (*DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*) fazendo uma ponte molecular entre ambas extremidades quebradas; (C) se as extremidades não são compatíveis para a ligação (devido à ausência de 3'-OH ou por presença de loops ou gaps no DNA) a nucleotidase *Artemis* em conjunto com *DNA-PKcs* degrada extremidades do DNA através da sua atividade de exonuclease; o complexo de *DNA ligase IV* realiza a etapa final de união com ganho (D) ou perda (E) de alguns nucleotídeos (Genois *et al.*, 2014).

Outro mecanismo alternativo descrito associado a formação de alterações cromossômicas estruturais é conhecido como união de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ – *Microhomology-Mediated End Joining*) e está envolvido na reparação de DSBs. A propriedade principal de MMEJ é o envolvimento de 5-25 pares de bases (pb) de homologia para o alinhamento das extremidades quebradas resultando em deleções que ladeiam a ruptura inicial. Após o alinhamento das extremidades, segmentos restantes de DNA não complementares formam abas de extremidade 3', que serão removidas antes da ligação. Esta remoção é forjada pelas endonucleases *Rad1-Rad10* ou o grupo de complementação F de Xeroderma Pigmentoso (*XPF*) – seu homólogo em mamífero. Este processo auxilia na associação estável das extremidades e proporciona um substrato adequado a partir do qual a síntese de DNA pode preencher as lacunas. Existem controvérsias quanto a classificação de MMEJ simplesmente como uma subclasse do emparelhamento de fita simples (*SSA – Single-Strand Anneling*) ou como sendo um mecanismo de formação de rearranjos estruturais isolado (McVey & Lee, 2008).

Caso a DSB ocorra entre sequências repetidas próximas, a via de reparação mais provável é SSA. Assim como MMEJ, as extremidades 3' da DSB formam abas que são removidas (Fig. 1.4.C). O SSA não requer invasão de fitas de DNA, o que é necessário nos demais mecanismos de reparo por recombinação homóloga (*HRR – Homologous Recombination Repair*).

O HRR é um mecanismo de reparo de DSBs em que a informação a partir de uma sequência de molde é usada para correção do dano. É uma via de reparação relativamente livre

de erros que ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, e que pode funcionar durante mitose e meiose (Mani & Chinnaiyan, 2010). Nesta situação, as extremidades quebradas são processadas primeiro em caudas de cadeia simples de DNA (ssDNA – *single-stranded DNA*), que invadem o cromossomo homólogo mediado por *RAD51* – responsável por catalisar o reconhecimento da homologia e troca de cadeias – para copiar deste as informações genéticas (Fig 1.4.F).

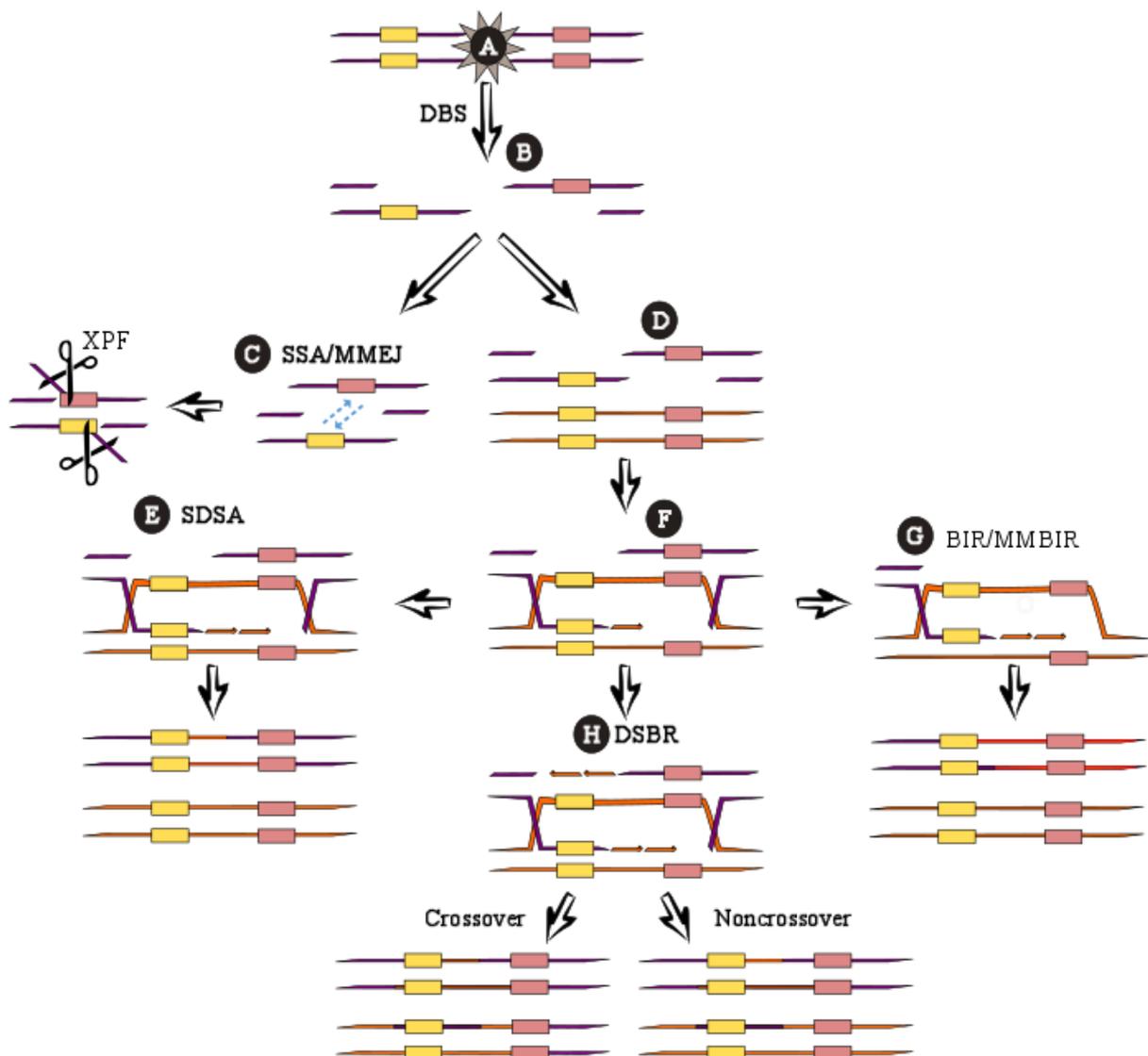


Figura 1.4: Mecanismos de reparo por recombinação homóloga (HRR). (A) quebra de dupla fita de DNA; (B) recessão das caudas 3'; (C) emparelhamento de fita simples (SSA) e união de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ) une as extremidades a partir de >30 e ~5-25 nts de homologia, respectivamente; (D): pareamento entre sequências; (E): Ligação dependente da síntese da cadeia de DNA (SDSA), onde apenas uma das fitas danificadas invade a fita não danificada; (F) invasão da fita não danificada; (G) replicação induzida por quebra (BIR) e replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (MMBIR), reparos durante a replicação com homologia de >50 e 2-15 nts respectivamente; (H) reparo de quebra de fita dupla (DSBR), onde ambas as fitas danificadas invadem a fita não danificada resultando em *crossover* ou *noncrossover* de acordo com a resolução das HJs.

De acordo com o modelo de ligação dependente da síntese da cadeia de DNA (SDSA – *Synthesis-Dependent Strand Annealing*), apenas uma cadeia é deslocada e emparelhada com a sua sequência complementar presente no cromossomo homólogo. O reparo é feito de acordo com o modelo da fita íntegra e a ligação completa a reparação da DSB, formando produtos *noncrossover* (Fig. 1.4.E). Já no modelo de Reparo de quebra de fita dupla (DSBR – *Double Strand Break Repair*) ambas cadeias invadem o cromossomo homólogo formando duas junções de Holliday (HJs). O resultado são produtos em *crossover* ou *noncrossover* dependendo de como as HJs forem resolvidas (Fig. 1.4.H) (Sung & Klein, 2006; Genois *et al.*, 2014).

Por último, quando o colapso ocorre durante a replicação, o mecanismo de HRR envolvido no reparo é conhecido por Replicação induzida por quebra (BIR – *Break-Induced Replication*). Nesta reação, a invasão ocorre como nos processos anteriores, com a peculiaridade da sequência invadida ser copiada até o fim (Fig. 1.4.G). Se a sequência que é utilizada para iniciar o mecanismo de BIR faz parte de uma família com sequências repetidas e está localizado em um cromossomo não homólogo, BIR pode resultar em uma translocação não recíproca, que une parte de um cromossomo com um cromossomo não homólogo. BIR proporciona um meio para o alongamento de telômeros encurtados. Uma vertente deste mecanismo, conhecido como Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (MMBIR – *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*) e atua da mesma forma, necessitando de regiões hoólogas menores (5-15 pb). Sendo assim, esta pode deslocar-se para forquilhas não homólogas com mais facilidade, induzindo a formação de deleções e duplicações segmentares, e extensa perda de heterozigidade (LOH – *Loss Of Heterozygosity*). (Sung & Klein, 2006; Hastings *et al.*, 2009; Sahoo *et al.*, 2015).

Lee *et al.*, 2007 propuseram ainda um novo mecanismo para a formação de rearranjos cromossômicos. O mecanismo FoSTeS foi proposto para explicar a complexidade de rearranjos não recorrentes sobrepostos em um únicos *loci*. Por meio de sequenciamento de pontos de quebra para analisar duplicações não recorrentes, os autores identificaram duplicações em *tandem* em 65% dos casos de doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD; OMIM 312080). Sendo que os rearranjos eram mais complexos com segmentos duplicados interrompidos por segmentos intactos, triplicados ou deletados. O FoSTeS baseia-se na correção durante a replicação do DNA, induzido por uma pausa em uma determinada posição genômica devido a uma lesão no DNA resultante da instabilidade genômica em regiões contendo LCRs. Ao ocorrer a interrupção da forquilha de replicação, a fita *lagging* (“atrasada”) transfere-se invadindo outras forquilhas fisicamente próximas, completando a replicação da fita *lagging* na forquilha original.

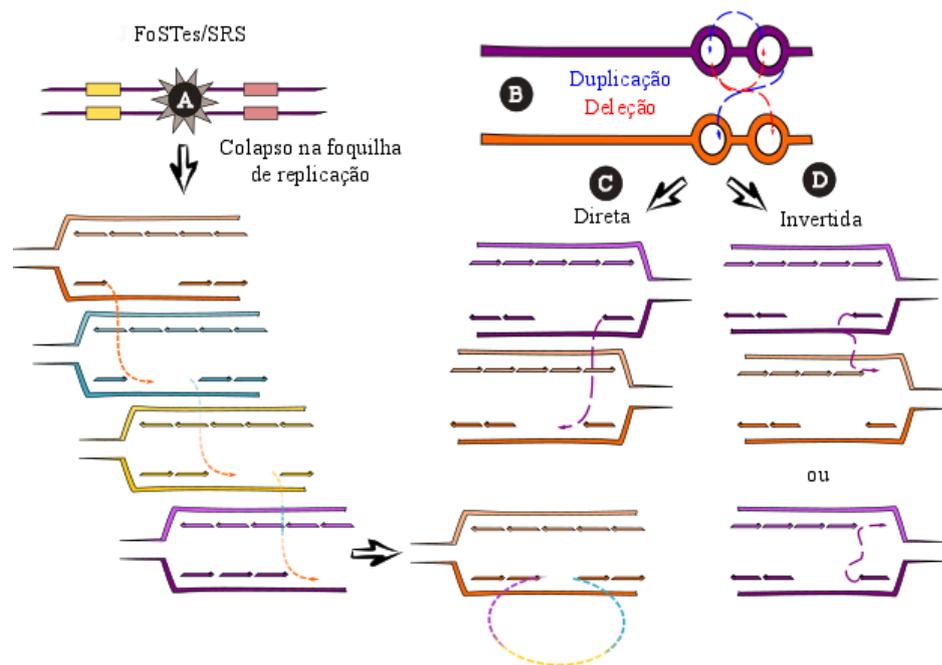


Figura 1.5: Colapso de forquilha com desvio do modelo (FoSTes). (A) Colapso de forquilha com desvio do modelo ou Derrapagem em série da replicação; resultado em inserção de nts de diferentes regiões genômicas; (B) FoSTes pode resultar em deleção ou duplicação dependendo se retroceder ou avançar as forquilhas; (C) FoSTes é direto se a derrapagem acontecer na fita com mesmo sentido da original; (D) FoSTes é invertido se a derrapagem acontecer na fita com sentido contrário a original.

As forquilhas têm de estar em proximidade física, entretanto podem ser separadas por distâncias lineares consideráveis permitindo o modelo impulsionar a união de diferentes sequências oriundas de posições genômicas distintas (Fig. 1.5.B). A mudança para outra bifurcação localizada a jusante (invasão para a frente) resultaria em uma deleção, ao passo que a mudança para uma forquilha localizado a montante (invasão para trás) resulta em duplicação. O fragmento incorporado incorretamente pode ser em orientação direta (Fig 1.5.C) ou invertida (Fig 1.5.D) da sua posição original, dependendo se a fitas descontínua ou continua forem copiadas na nova forquilha. Este procedimento de desengate, invasão, anelamento, síntese e extensão pode ocorrer várias vezes em série (Lee *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2008).

O tipo de rearranjo cromossômico a ser formado, depende da orientação dos LCRs (Fig. 1.6). Quando ambos os LCRs estão em orientação direta no mesmo cromossomo, deleções ou duplicações podem ser geradas, ocorrendo frequentemente como mutações *de novo* e associadas a distúrbios genômicos recorrentes e esporádicos. Quando estão no mesmo cromossomo, mas em orientação oposta, NAHR resulta em inversão do fragmento flanqueado por ela. Na meiose, NAHR pode localizar-se entre parálogos na mesma cromátide (intracromátide), em cromátides irmãs (intracromossômico ou intercromátide) ou entre cromossomos homólogos (intercromossômicos). Entre duas LCR com orientação direta,

rearranjos intercromátide e intercromossômicas resultam em duplicação e deleção, enquanto rearranjos intracromátide resultam em deleção com a formação subsequente de um fragmento em anel que, por ser acêntrico poderá ser perdido. O mecanismo NAHR favorece deleções ao longo de duplicações, porque deleções podem resultar de *crossovers*, tanto em *cis* e *trans*, ao passo que as duplicações só podem resultar de *crossovers* em *trans* (Stankiewicz & Lupski, 2002; Gu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012).

Sugere-se que o mecanismo NAHR flanqueado por LCRs presentes em cromossomos distintos (ou seja, não homólogos) também resultem em translocações recíprocas balanceadas e são frequentemente associados a pontos de quebra e rearranjos evolucionários devido à alta similaridade entre sequências duplicadas. O tamanho das inversões, duplicações e deleções produzidas pelos eventos de recombinação são dependentes do comprimento e proximidade das LCRs. Em geral, quanto maior a região rearranjada, maior a LCR que medeia o evento (Lupski, 1998; Goidts *et al.*, 2006; Stankiewicz & Lupski, 2010; Ou *et al.*, 2011).

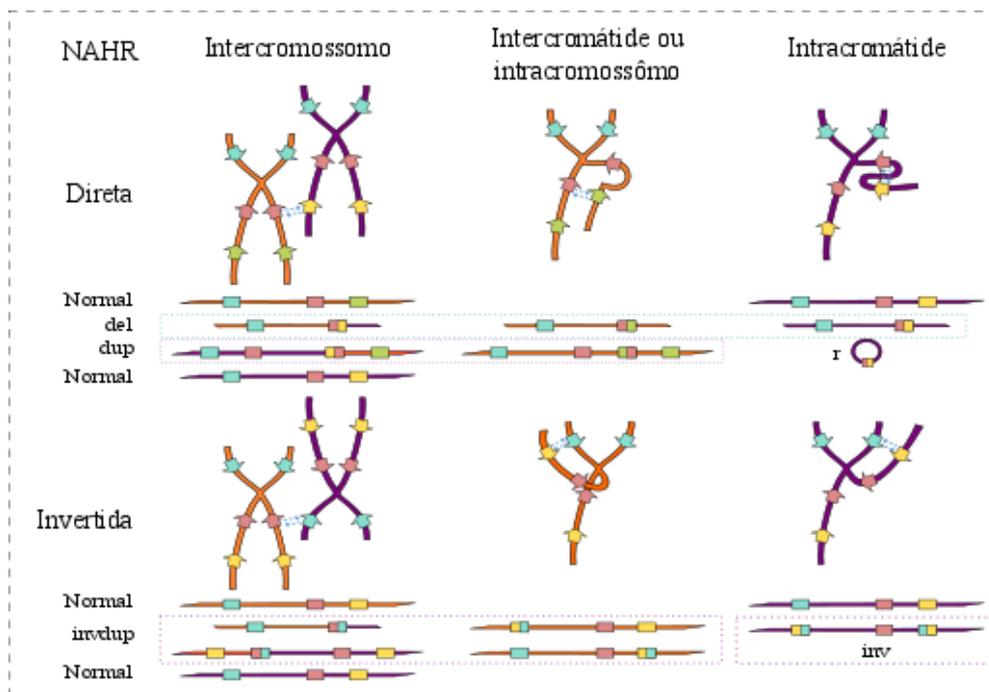


Figura 1.6: Esquema demonstrando os tipos e possíveis resultados da recombinação homóloga não alélica (NAHR). Esta acontece entre sequências não homólogas mas com elevada semelhança presentes em cromossomos distintos (intercromossomo), cromátides irmãs (intercromátide ou intracromossomo) ou entre duas regiões na mesma cromátide (intracromátide). Dependendo se as sequências estiverem na mesma orientação ou em orientação oposta a NAHR é direta ou invertida, respectivamente. NAHR direta pode formar deleções (del), duplicações (dup) e cromossomos em anel (r), enquanto que NAHR invertida forma inversões (inv) e duplicações invertidas (invdup).

Como mencionado anteriormente, os rearranjos cromossômicos estruturais patogênicos podem ser recorrentes, com tamanhos constantes e pontos de quebra que não se alteram, ou

podem ser não-recorrentes, com tamanhos diferentes e pontos de quebra variáveis. Os pontos de quebra variáveis dos rearranjos não recorrentes podem estar dispersos em uma mesma região ou agrupados em um dos lados, mas com uma região de sobreposição comum (SRO – *Smallest Region of Overlap*) (Gu *et al.*, 2008). Alterações cromossômicas constitucionais com alta recorrência resultam de NAHR entre LCRs, que podem incluir genes/pseudogenes e sequências repetitivas diversas, em *tandem* ou invertidas (Shaw & Lupski, 2004). Essas alterações são principalmente duplicações e deleções que condicionam diversas síndromes.

Malformações congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual são condições clínicas que podem estar relacionadas a síndromes causadas por microdeleções/microduplicações de pequenos segmentos cromossômicos, sejam eles terminais ou intersticiais. Semelhante as alterações terminais, as anomalias cromossômicas intersticiais surgem da interação entre duplicações segmentares cromossomo-específicas, tornando determinadas regiões cromossômicas particularmente propensas a formação de rearranjos estruturais (Shaw & Lupski, 2004; Sibbons *et al.*, 2012).

Tabela 1: Condições para a ocorrência e desfecho dos mecanismos detalhados acima.

<i>Mecanismo</i>	<i>Homologia (nts)</i>	<i>Fase do Ciclo celular</i>	<i>Desfecho</i>
<i>NHEJ</i>	–	G2	deleção ou adição de nts./translocação
<i>SSA</i>	>30	–	deleção
<i>MMEJ</i>	~5-25	S/G2	deleção /translocação
<i>NAHR</i>	50 300-500	Mitose/ Meiose	deleção/duplicação/inversão/translocação
<i>DSBR</i>	337 e 456	S/G2/Mitose/ Meiose	deleção/duplicação/inversão/translocação
<i>SDSA</i>	337 e 456	S/G2/Mitose/ Meiose	deleção/duplicação/inversão/translocação
<i>BIR</i>	>50	S	deleção/duplicação/inversão/LOH
<i>MMBIR</i>	2-15	S	deleção/duplicação/inversão/LOH
<i>FoSTeS</i>	2-5	S	deleção/duplicação (direta ou invertida)
<i>SRS</i>	2-5	S	deleção/duplicação (direta ou invertida)

NHEJ (*Nonhomologous DNA end joining*); *SSA* (*Single-Strand Anneling*); *MMEJ* (*Microhomology-Mediated End Joining*); *NAHR* (*Nonallelic Homologous Recombination*); *DSBR* (*Double-Strand Break Repair*); *SDSA* (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*); *BIR* (*Break-Induced Replication*); *MMBIR* (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*); *FoSTes* (*Fork Stalling and Template Switching*); *STS* (*Serial Replication Slippage*); nts: nucleotídeos; S: Fase S (*Synthesis phase*); G2: *Gap2 phase*; LOH: Perda de heterozigidade (*Loss Of Heterozygosity*).

1.4. VARIANTES ESTRUTURAIS ASSOCIADAS A DOENÇAS GENÔMICAS

Sabe-se que humanos diferem seus cromossomos a nível submicroscópico e que as CNVs ocorrem com alta frequência como polimorfismos de número de cópias. Estas são tidas com uma espécie de variantes estruturais (SVs), definidas como segmentos de DNA maior ou igual a 1 Kb, cujo número de cópias em um dado indivíduo se mostra variável devido à perda ou ganho de material genético em comparação com o genoma de referência (Feuk *et al.*, 2006). As alterações no número de cópias têm sido associadas com fenótipos que são frequentemente difíceis de determinar tais como a susceptibilidade à infecção por HIV. Em larga escala CNVs contribuem significativamente para a variabilidade genômica interindividual em seres humanos e, potencialmente, também para susceptibilidade à doença (Lupski & Stankiewicz, 2005; Goidts *et al.*, 2006; Edelman *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2010; Riggs *et al.*, 2014).

Estima-se que cerca de 12% da eucromatina possa variar sem que ocorra um efeito fenotípico. Uma porção adicional de cerca de 20% do genoma consiste de heterocromatina extremamente variável, concentrada ao redor de regiões centroméricas e teloméricas que contém poucos genes (Liehr, 2014).

A instabilidade do genoma contribui enormemente para processos de mutação durante a evolução do genoma humano, em associação com doenças humanas e com a variação polimórfica em populações (Eichler, 1998; Tuzun *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2014). Estima-se que cerca de 6% dos casos de defeitos congênitos ocorram devido à presença de anomalias cromossômicas. Essa prevalência é, provavelmente, subestimada, uma vez que malformações mais graves podem levar a perdas fetais antes que um diagnóstico seja possível e, algumas vezes, as alterações cromossômicas ou desequilíbrios genômicos associados às malformações congênitas não são identificados. A partir do desenvolvimento de novas tecnologias para a detecção de alterações no DNA, o número de desequilíbrios genômicos identificados têm crescido rapidamente e várias doenças genômicas e síndromes malformativas vêm sendo descritas nos últimos anos (Vissers & Stankiewicz, 2012).

Determinadas regiões do genoma possuem características estruturais que as predis põe a rearranjos. Esses rearranjos resultam em desequilíbrios que originam as chamadas doenças genômicas (Lupski, 1998). Doenças genômicas são condições patológicas causadas por rearranjos no genoma, como as inversões, duplicações, deleções, inserções e translocações (Gu *et al.*, 2008; Mani & Chinnaiyan, 2010; Lupski, 2015). Estes distúrbios têm características

genômicas semelhantes nas regiões suscetíveis de rearranjo mas representam uma vasta gama de entidades clínicas não relacionadas (Lee *et al.*, 2007).

As doenças genômicas diferenciam-se dos mecanismos clássicos de uma doença genética, em que um fenótipo anormal é principalmente originado por mutações de ponto. Eventos de recombinação que são separados por grandes regiões do genoma (pelo menos 3-5 Mb) ou que estão localizados em cromossomos diferentes, podem produzir rearranjos cromossômicos a nível de resolução microscópica envolvendo múltiplos genes. Dentro deste grupo estão as síndromes de microdeleção e microduplicação (Lupiski, 1998; Eichler, 1998; Ji *et al.*, 2000; Shaffer *et al.*, 2007; Vissers & Stankiewicz, 2012; Nevado *et al.*, 2014).

Apesar de individualmente raras, a soma das prevalências das anomalias cromossômicas e das doenças multifatoriais torna as doenças genéticas relativamente frequentes em seu conjunto (Schinzel, 2001). A etiologia de mais de 50% dos defeitos congênitos ainda é desconhecida, e por serem patologias individualmente pouco frequentes, entre outros fatores, são difíceis de investigar (Calvo *et al.*, 2012).

Variações genômicas que perturbam a condição diploide, como deleção, duplicação ou triplicação de material genômico, podem ter como consequência um fenótipo anormal. A variação no genoma humano está presente em muitas formas, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo, polimorfismos de pequenas inserções-deleções, número variável de sequências repetitivas e alterações estruturais genômicas, que são duplicações e deleções grandes (Iafrate *et al.*, 2004).

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

As CNVs podem ocorrer em parte das sequências de um gene ou em um gene inteiro. Podem também estar presentes em um segmento contendo vários genes ou em elementos regulatórios. Considerando esses fatores, tem-se sugerido que várias CNVs contribuem para o desenvolvimento de doenças através da influência na alteração de funções fisiológicas. As CNVs intragênicas ou que abrangem um único gene podem ter consequências funcionais similares às das mutações de ponto patogênicas. As CNVs maiores podem incluir múltiplos

genes, levando a síndromes de genes contíguos (Lee *et al.*, 2007; Lee & Scherer, 2010; Liehr, 2014).

A maioria das CNVs, em um genoma individual não são decorrentes de novas mutações, mas de CNPs compartilhadas com várias outras pessoas (Sebat *et al.*, 2004; Tuzun *et al.*, 2005; Mills *et al.*, 2011). Os CNPs são frequentemente localizados próximos a outros tipos de rearranjos genômicos e muitos ocorrem dentro de regiões genômicas conhecidas de rearranjos recorrentes associados a síndromes, como Prader-Willi/Angelman, DiGeorge/Velocardiofacial e atrofia muscular espinhal. Esses CNPs não implicam diretamente na condição da doença, mas podem estar refletindo em uma instabilidade dessas regiões genômicas (Sebat *et al.*, 2004; Lupski, 2015).

Alterações no número de cópias de genes sensíveis a dosagem, como por exemplo *PMP22*, *PLP1*, *RAI1* ou *MECP2* e cuja expressão no sistema nervoso é finamente regulada, podem causar um fenótipo clínico grave [respectivamente, Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicação de *PMP22*), Doença de Pelizaeus-Merzbacher (duplicação ou deleção de *PLP1*), Síndrome de Potocki-Lupski (duplicação de *RAI1*) ou Smith-Magenis (deleção de *RAI1*), Síndrome de duplicação do *MECP2*]. Os CNVs podem ocasionar alteração da expressão gênica e gerar variações fenotípicas diretamente pela simples falta ou excesso da região genômica em questão, mas também indiretamente através de efeitos de posição (Lupski & Stankiewicz, 2005; Lupski, 2015). Em alguns casos podem conferir riscos a doenças complexas tais como glomerulonefrite (Aitman *et al.*, 2006) e infecção ao HIV-1 (Gonzalez *et al.*, 2005) mas também podem ser o fator causativo minoritário em doenças como Parkinson e Alzheimer (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006).

A prevalência dos CNVs como mecanismo molecular de determinadas doenças ou grupo de doenças é variável e depende de fatores distintos como indicação clínica, tipo de herança, arquitetura genômica no *loci* associado à doença em questão, métodos empregados no estudo, se a doença é causada por alteração estrutural em um único gene ou se é uma síndrome causada por alterações em genes contíguos, etc. Um grupo de pacientes especialmente susceptível a apresentar CNVs são os recém-nascidos com anomalias congênitas (Lu *et al.*, 2008; Dorfman *et al.*, 2014; Huber *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015). Outros grupos de pacientes com alta probabilidade de portar CNVs clinicamente significativos são os pacientes com deficiência intelectual e atraso de desenvolvimento (Hochstenbach *et al.*, 2011). Sebat *et al.*, (2007) relatam que os CNVs *de novo* são mais frequentemente encontrados em crianças autistas do que em crianças sem histórico de autismo e estudos recentes mostram que pacientes com autismo, esquizofrenia, e doença bipolar apresentam um maior número de CNVs raros e

maiores do que 100 Kb assim como uma alta frequência de CNVs *de novo* (5-10% no caso de indivíduos com transtorno de espectro autista) comparado com indivíduos-controle sem estas doenças (Malhotra & Sebat, 2012; Maillard *et al.*, 2015).

Enquanto os rearranjos recorrentes não possuem padrões de herança preferencial, os rearranjos não recorrentes parecem ter preferencialmente uma herança paterna. Tem sido documentado, que a maioria dos casos de duplicação *CMT1A* e dos casos de inversão do fator VIII, ocorrem devido a rearranjos no cromossoma herdado do pai. Estes dados sugerem que os requisitos de HRR para rearranjos genômicos resultantes em desordens diferem por vezes para a gametogênese masculina e feminina (Lupski, 1998; Liu *et al.*, 2012; Sibbons *et al.*, 2012).

Embora a maioria dos rearranjos estruturais à nível de resolução microscópica resultem em um fenótipo clínico, a maioria dos portadores não é de fato diagnosticado, sendo necessária a aplicação de métodos de investigação mais apurados e estudos adicionais para a definição da alteração genômica associada a condição clínica que se apresenta.

1.5. INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA E SUAS APLICAÇÕES NO ESTUDO DAS VARIACÕES GENÔMICAS EM HUMANOS

As técnicas utilizadas para investigação citogenética progrediram consideravelmente a partir da década de 50, com a descoberta de estimuladores de cultura e processamento celular mais adequados e de tecnologias inovadoras com maior resolução de detecção de alterações genômicas (Fig. 1.7). O mapeamento genético é frequentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlações entre alterações cromossômicas ou genômicas associadas aos fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias que apresentam vários indivíduos afetados. Na primeira abordagem, a presença de alterações associadas à fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra, a monossomia ou a duplicação de segmentos, possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a condição observada.

As técnicas citogenéticas clássicas utilizadas para o estudo de cromossomos incluem bandeamento cromossômico, com uma resolução limitada em várias situações, e que não permite relacionar de forma acurada o genótipo com uma condição clínica. Por esse motivo, ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos métodos com uma maior resolução de detectar desequilíbrios genômicos utilizando instrumentos de biologia molecular aplicados a citogenética (citogenética molecular). A aplicação de métodos de citogenética molecular permite uma análise mais detalhada dos cromossomos e de sua arquitetura genômica possibilitando, através da análise citogenômica, cada vez mais a identificação e caracterização de desequilíbrios genômicos associados às doenças em humanos e rearranjos cromossômicos (Bejjani & Shaffer 2008; Le Scouarnec & Gribble, 2012).

1.5.1. CITOGENÉTICA CLÁSSICA

As pesquisas em citogenética humana se iniciaram em 1879 com o patologista alemão Arnold, examinando células de carcinoma e sarcoma. Flemming e Hansemann foram os primeiros a examinarem cromossomos humanos mitóticos. Ao final do século XIX, Waldeyer propôs o termo “cromossomo” em 1888, significando “corpo colorido”. Os primeiros cientistas a descreverem o número correto de 46 cromossomos humanos foram Tijo & Levan (1956) utilizando método de tratamento de choque hipotônico em células de fibroblastos de pulmão cultivadas. As técnicas de cultivo celular de sangue periférico e preparo de material para microscopia foram melhoradas por Moorhead *et al.* (1960) ao utilizar colchicina para reter as células na etapa de metáfase do ciclo celular, e Nowell (1960), ao descobrir a atividade mitógena da fitohemaglutinina. Técnicas para cariotipagem de cromossomos fetais foram

implantadas por Steele & Breg Jr. (1966) utilizando líquido amniótico, e em meados de 1970 foi desenvolvida a técnica para cultivo de vilosidades coriônicas (Hahnemann, 1974), melhorada posteriormente por Niazi *et al.* (1981) e Brambati & Simoni (1983).

Esses resultados abriram caminho para o desenvolvimento da citogenética humana e dos primeiros relatos de cariótipos humanos anormais. Em 1958, Lejeune *et. al.*, descreveram a presença de um cromossomo pequeno adicional no cariótipo de nove crianças com síndrome de Down, a trissomia do cromossomo 21. Os trabalhos subsequentes descreveram anormalidades de número de cromossomos sexuais, especificamente, a presença de um cromossomo X extranumerário na síndrome de Klinefelter (Jacobs & Strong, 1959) e o cariótipo com 45 cromossomos, contendo apenas um cromossomo X na síndrome de Turner (Ford *et al.*, 1959), seguidos pelas demais trissomias, compatíveis com a vida, correspondentes aos cromossomos 13 e 18, síndrome de Patau e Edwards, respectivamente.

O nível de resolução de uma técnica citogenética é determinado pelo número de bandas visíveis. Com as técnicas de bandas e de maior resolução (800 a 2.000 bandas), tornou-se possível identificar algumas anormalidades cromossômicas estruturais associadas à fenótipos característicos e resultantes de desequilíbrio de dosagem de segmentos cromossômicos específicos. Em situações especiais pode-se indicar o bandeamento de alta resolução, em que são analisados os cromossomos durante a prófase ou prometáfase (Maluf & Riegel, 2011).

A análise cromossômica por bandeamento permanece como um dos exames genéticos mais comuns e acessíveis realizados para diagnóstico, tanto na área de pediatria e oncologia quanto na de obstetria/ginecologia. Esse método, porém, apresenta várias limitações. As técnicas de citogenética clássica, baseadas em bandeamentos cromossômicos, permitem o diagnóstico de alterações cromossômicas estruturais com a identificação de deleções, inversões, inserções, translocações e outros rearranjos cromossômicos. No entanto, muitas alterações estruturais, como pequenas deleções e duplicações menores do que 4 Mb, cromossomos marcadores e rearranjos cromossômicos complexos, não são possíveis de serem identificadas e/ou bem caracterizadas. Além disso, os procedimentos citogenéticos clássicos necessitam de cultivo celular para a obtenção de cromossomos em metáfase e estão limitados a certas células e tecidos.

O limite de resolução alcançada com as técnicas de citogenética convencional foi superado com o advento das técnicas de citogenética molecular. As primeiras aplicações das técnicas moleculares para análise de cromossomos foram a utilização de moléculas fluorescentes marcadas direta ou indiretamente para a visualização de sequências de DNA conhecidas diretamente nos segmentos cromossômicos. O método de Hibridização *in situ* por

florescência (FISH) aumentou a resolução para identificação de rearranjos cromossômicos em níveis submicroscópicos, tornando este método aplicável para diagnóstico clínico e pesquisa (Volpi & Bridger, 2008).

1.5.2. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

No final da década de 80, o estudo de cromossomos em humanos foi muito beneficiado pelo desenvolvimento de métodos não isotópicos de hibridação *in situ* que permitiu a detecção de alterações submicroscópicas. O método mais comum é o FISH (Pinkel *et al.*, 1986). A otimização do método de hibridação *in situ* resultou no desenvolvimento de diferentes técnicas baseadas no princípio da hibridação *in situ* fluorescente, entre eles o cariótipo espectral (SKY) (Liyanaige *et al.*, 1996) e multicolor FISH (m-FISH) (Uhrig *et al.*, 1999). Nesses métodos a combinação de fluorocromos permite identificar cada um dos 23 pares de cromossomos. O princípio do método de FISH baseia-se na utilização de sondas de DNA contendo dois elementos, um denominado inserto (i.e., o DNA humano complementar à sequência alvo no cromossomo) e o vetor (i.e., uma sequência de DNA não relacionada na qual o inserto será clonado e através do qual o DNA poderá ser replicado). As sondas são fragmentos de DNA genômico capazes de se ligarem à suas cadeias complementares, produzindo um sinal fluorescente quando ocorre hibridização.

As preparações citogenéticas são realizadas através de procedimentos citogenéticos de rotina. O DNA cromossômico e o da sonda são desnaturados e colocados em temperatura adequada para haver hibridização. Se houver complementaridade das bases da sonda e do DNA alvo, haverá hibridização, à qual é identificada através dos fluorocromos utilizados para a marcação da sonda. A hibridização da sonda ao DNA alvo é observada em microscópio de fluorescência. Atualmente, existe uma variedade de tipos de sondas que podem ser utilizadas por FISH para investigar segmentos específicos do genoma. As sondas de sequência única repetitiva para centrômero possibilitam identificar o número de cópias de cromossomos específicos ou a origem de pequenos cromossomos supranumerários (marcadores); as sondas de sequência única auxiliam na identificação de deleções e duplicações associadas com síndromes de genes contíguos ou outras síndromes causadas por microrrearranjos de um único loco (Riegel *et al.*, 2015); e, as sondas de biblioteca de DNA (“pintura cromossômica”), que consistem em uma coleção de sondas que podem ser utilizadas para identificar a origem do material não identificado em translocações ou outros rearranjos complexos (Rautenstraub & Liehr, 2002).

A hibridização pode ser realizada em cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras cromossômicas estendidas ou em microarranjos (*arrays*) de DNA. Amostras de diferentes origens podem ser analisadas: amostras pós-natais (sangue, pele, medula óssea, linfonodos, tumores sólidos), amostras pré-natais (amostras de vilosidades coriônicas, de líquido amniótico ou sangue fetal) e de embriões pré-implantação (uma célula do blastocisto).

A fusão dos termos citogenética molecular e genômica, que pode ser referida como citogenômica, expressa e se refere à triagem de alterações genômicas por métodos de citogenética molecular. O método de *array*-CGH traz uma abordagem eficiente para triagem total do genoma para variações no número de cópias (ganhos/duplicações e perdas/deleções) em um único experimento. O número, tamanho e distribuição dos segmentos de DNA na lâmina de vidro determinam a resolução do *array*, quanto maior o número de fragmentos, maior a resolução.

1.5.3. HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA BASEADA EM MICROARRANJOS (ARRAY-CGH)

Como discutido nas sessões anteriores, os métodos clássicos utilizados para o estudo de cromossomos incluem bandeamento cromossômico, com uma resolução limitada. Por este motivo, foram desenvolvidas e têm-se utilizado técnicas que empregam instrumentos de biologia molecular aplicadas à citogenética. A citogenômica utiliza métodos, como por exemplo *array*-CGH, que permitem a detecção da variação do número de cópias de DNA ao longo do genoma em uma única análise. O uso desta tecnologia tem possibilitado o diagnóstico molecular de alterações cromossômicas submicroscópicas previamente não detectadas, principalmente em indivíduos com deficiência intelectual e/ou múltiplas malformações congênitas de causa desconhecida. Esta possibilidade aumenta consideravelmente a detecção de rearranjos cromossômicos em desequilíbrio no genoma.

Desenvolvida em 1992, a técnica de CGH consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes. A técnica original utilizava metáfases normais fixadas em lâmina e é conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional (Kallioniemi *et al.*, 1992). Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e utilizando a tecnologia de matriz de DNA (*microarrays* ou *arrays*) (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998), foi possível o desenvolvimento de uma metodologia de análise do genoma, agora baseada em microarranjos, conhecida como *array*-CGH. Basicamente, a técnica utiliza vários fragmentos pré-selecionados de DNA anexados, em uma superfície (lâmina de vidro ou polipropileno),

gerando uma matriz de DNA. No método de *array*-CGH, utiliza-se como alvo de hibridização, em lugar de cromossomos metafásicos, um conjunto de sondas organizadas em alta densidade.

No processo de *array*-CGH o DNA genômico do sujeito que se pretende estudar (DNA teste) e o da amostra controle (DNA referência) são marcados pela incorporação de um precursor de nucleotídeo contendo um fluorocromo apropriado (por ex., Cy5 dCTPs ou Cy3 dCTPs) que fluoresce quando exposto à luz de um comprimento de onda específico. O DNA teste, junto com quantidades iguais de DNA controle (normal) marcados, são co-hibridizados a uma matriz de DNA contendo segmentos de DNA (clones) pré-selecionados correspondentes às diferentes localizações cromossômicas. Cerca de milhares ou milhões de clones de DNA mapeados e representativos do genoma são imobilizados em placa ou lâmina e são usados como a fase sólida para a hibridação (Riegel, 2014).

Os fragmentos clonados de DNA que inicialmente substituíram os cromossomos metafásicos têm localização conhecida nos cromossomos e podem ser diretamente relacionados às sequências do genoma humano. A distância entre cada alvo imobilizado pode variar desde alguns milímetros até poucos micrômetros, dependendo da plataforma de *arrays* utilizada. A molécula imobilizada em uma lâmina ou placa é indicada como uma sonda, enquanto o alvo é a molécula em solução exposta a matriz de DNA. Após a co-hibridização, a fluorescência emitida por cada clone é capturada por “varredura” de fluorescência, utilizando-se um *escanner a laser*.

Uma imagem fluorescente é gerada e a intensidade de fluorescência emitida pelo DNA teste e pelo DNA de referência é comparada. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um programa de conversão de dados da intensidade de hibridização para um perfil linear. As regiões com intensidade fluorescentes equivalentes aparecem como uma mistura dos DNAs teste e de referência, que resulta em amarelo, tendo um índice normalizado correspondente a 1.0. As regiões com perda de sequências de DNA (deleção) apresentam um índice significativamente menor que 1.0; as regiões com ganhos de sequência de DNA (amplificação) apresentam índice significativamente maior que 1.0 (Riegel, 2014).

Estudos de alterações de número de cópia por meio de triagem genômica utilizando o método de *array*-CGH vêm sendo amplamente aplicados em uma enorme variedade de grupos de pacientes com condições clínicas diversas incluindo anomalias congênitas, deficiência mental, esquizofrenia, epilepsia e autismo, entre outras (Sebat *et al.*, 2007; Hochstenbach *et al.*, 2011; Vianna *et al.*, 2016). Estes estudos mostram que deleções e duplicações patogênicas estão presentes em 6.7-17.7% dos indivíduos testados, número significativamente maior que o

da população controle (Hochstenbach *et al.*, 2011). A análise citogenômica tem levado à descoberta de novas síndromes que foram clinicamente delineadas somente após a determinação da alteração cromossômica. Os fenótipos de várias dessas síndromes são mais raros e possuem menos características clínicas específicas, como atraso no desenvolvimento e diferenças comportamentais (Deak *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2012; Vergult *et al.*, 2012; Zeesman *et al.*, 2012; Hancarova *et al.*, 2013; Thevenon *et al.*, 2013; Nevado *et al.*, 2014; Riegel, 2014; Kharbanda *et al.*, 2015; Vianna *et al.*, 2016)

O aumento do número de laboratórios em todo o mundo aplicando métodos baseados em microarranjos para o diagnóstico de pacientes com anormalidades congênicas múltiplas tem contribuído para detecção de desequilíbrios genômicos em humanos e levado à identificação do número de doenças causadas por microdeleções e/ou microduplicações cromossômicas (Nevado *et al.*, 2014; Riegel, 2014; Dorfman *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015).

Desta forma, as técnicas de citogenética molecular têm sido cruciais para elucidação de doenças genômicas (Lupski, 1998; Carvalho & Lupski 2016), as quais estão categorizadas entre as alterações mendelianas, causadas por mutação de ponto, e as doenças cromossômicas visíveis ao microscópio (Simmons *et al.*, 2012; Carvalho & Lupski 2016).

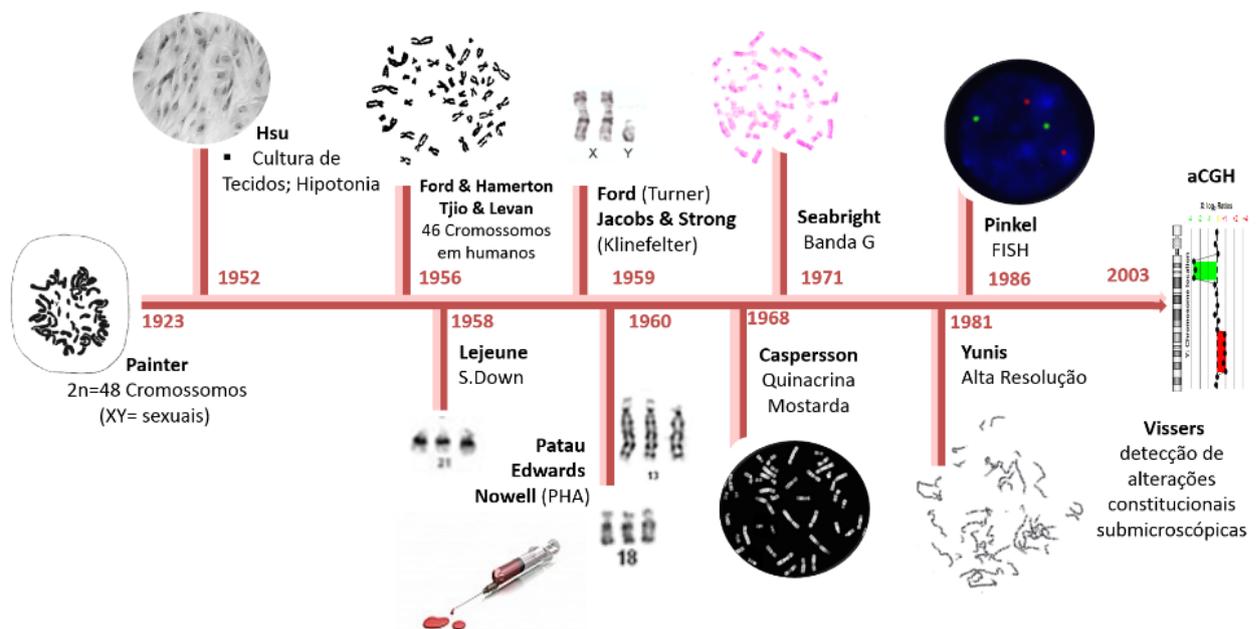


Figura 1.7: Desenvolvimento cronológico dos métodos citogenéticos.

CAPÍTULO 2
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICATIVA

A ocorrência de rearranjos que afetam os mesmos segmentos cromossômicos sugere a presença de mecanismos de recombinação específicos para a sua formação. A possibilidade de se traçar um perfil cromossômico nessas situações pelo estudo citogenômico de rearranjos cromossômicos complexos possibilitará a obtenção de mapas genéticos de alta densidade. A realização de um trabalho de pesquisa científica com essa abordagem deverá contribuir para o entendimento dos mecanismos de formação dos rearranjos cromossômicos complexos. Além disto, este estudo poderá contribuir para o melhor entendimento do efeito fenotípico dos rearranjos do genoma dos indivíduos estudados. A identificação e a caracterização citogenômica dos rearranjos é de grande importância para se estabelecer a etiologia cromossômica precisa dos quadros apresentados. Inicialmente, irá proporcionar o aconselhamento genético adequado para o portador e seus familiares, permitindo também o rastreio pré-sintomático de complicações que poderão estar associadas com as condições clínicas investigadas. Com a definição do tipo de rearranjo e de sua origem, é possível realizar uma avaliação do risco de recorrência no contexto do aconselhamento reprodutivo, podendo tornar disponível a identificação do portador, bem como o diagnóstico pré-natal. Baseado no tipo de rearranjo, um prognóstico a curto e longo prazo pode ser inferido, possibilitando outras formas de assistência, além da educativa. Acredita-se que a proposta de delineamento molecular de pontos de quebra e mapeamento físico de rearranjos cromossômicos associados a malformações congênitas, além de compor uma investigação científica que busca melhor compreender as bases moleculares da formação dos rearranjos genômicos, tem um componente de atualização tecnológica na área de citogenética clínica. Dessa maneira, acreditamos que este projeto contempla a pesquisa básica, que se propõe a buscar o entendimento da origem das variantes genômicas estruturais, e a pesquisa aplicada, com repercussões diretas no atendimento às necessidades da área da saúde.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse projeto é caracterizar do ponto de vista citogenômico, por meio de FISH e *array*-CGH, variantes cromossômicas estruturais patogênicas (deleções, duplicações e triplicações) associadas a quadros clínicos de malformações congênitas múltiplas, em amostras armazenadas em repositórios de material biológico.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.2.1. Classificar os diferentes tipos de rearranjos cromossômicos estruturais detectadas;

2.2.2.2. Identificar os pontos de quebra genômicos de deleções e duplicações cromossômicas;

2.2.2.3. Determinar os mecanismos de origem e formação dos rearranjos cromossômicos estruturais;

2.2.2.4. Estimar a relevância de ganhos e perdas de sequências do genoma envolvidos na formação de rearranjos estruturais patogênicos para a etiologia de anomalias congênitas específicas

CAPÍTULO 3

Chromosomal Structural Rearrangements: characterizing interstitial deletions and duplications in the clinical practice

Artigo em revisão, Biomedical Research International, Special Issue, 2016

Annual Special Issue on "Laboratory Genetic Testing in Clinical Practice 2016" Posteingang x



 **BMRI: Genetics** <bmri.genetics@journals.hindawi.com>
an mich ▾

3. Feb. ☆



Dear Dr. Riegel,

The Research Article titled "Chromosomal Structural Rearrangements: characterizing interstitial deletions and duplications in the clinical practice" by Rafaella Mergener, Rafael Fabiano Rosa and Mariluce Riegel has been received and assigned the number 1675455526160612.

Thank you for submitting your work to Genetics subject area of BioMed Research International - Annual Special Issue on "Laboratory Genetic testing in Clinical Practice 2016".

Kind regards,

Adam Mohamed
Editorial Office BioMed Research International
Hindawi Publishing Corporation

Chromosomal Structural Rearrangements: characterizing interstitial deletions and duplications in the clinical practice

Rafaella Mergener¹, Rafael Fabiano Rosa^{3,4}, Mariluce Riegel^{1,2}

¹Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

²Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Clinical Genetics, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) and Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), RS, Brazil.

⁴Clinical Genetics, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), RS, Brazil.

Author e-mail addresses:

rafa.mergener@gmail.com

rfmrosa@gmail.com

mriegel@hcpa.edu.br

Corresponding author and author for pre-publication contact:

Mariluce Riegel

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: + 55 51 3359 8011; Fax: + 55 51 3359 8010; E-mail: mriegel@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Structural chromosomal rearrangements are traditionally diagnosed based upon clinical manifestations and conventional chromosome analyses. Cytogenetic analysis through GTG-banding in combination with a clinical evaluation was sufficient to detect the genomic imbalances presented here. However, several studies have demonstrated the importance of delimitating of the break-points and the extent of the deleted and/or duplicated region for the better definition of the clinical implications, prognosis and genotype-phenotype correlation. Refined molecular techniques, such as fluorescence in situ hybridization (FISH) and array based comparative genomic hybridization (array-CGH), are required for the characterization of the type of the chromosomal structural rearrangements, for more precise analysis of break points, for confirmation of critical regions and for the evaluation of new alterations not detected previously. We report here the detection of four interstitial deletions and duplications associated with congenital malformations and/or neurological abnormalities and how cytogenomic technologies allow the expansion of characterization of chromosome rearrangements in the clinical practice.

KEYWORDS: FISH, array-CGH, structural rearrangements, deletions and duplications, multiple congenital abnormalities

INTRODUCTION

Chromosomal structural rearrangements can result from different mutational mechanisms, including DNA recombination-, replication- and repair-associated processes. Thus, structural variants (SVs) arise from improperly repaired DNA double-strand breaks (DSB). DSBs are a frequent occurrence in all classes and two major pathways are involved in their repair: homologous recombination and non-homologous end joining. However, homologous recombination appears to be the predominant pathway underlying recurrent rearrangements of our genome [1]. Errors on during these repair mechanisms can result in SVs that involve losses, gains and rearrangements ranging from a few nucleotides to entire chromosomal arms. Factors such as rearrangements, hotspots and induced DSBs are implicated in the formations of SVs [2,3]. Current approaches to understand the formation of chromosomal structural rearrangements in the human genome include the direct observation of human genomic alterations, or rearrangement end products, that convey a disease trait. Studying disease-causing structural rearrangements as chromosomal deletions and duplications provides an opportunity to explore the genomic mechanisms leading to such events. In addition to identify genomic structural rearrangements, several studies have revealed complex exonic, genic and chromosomal rearrangements that can be generated in a single mutagenic event [4,5,6]. Other studies have shown that the formation of structural rearrangements can be accompanied by additional genome modification that may result in a disease trait [7,8,9,10]. Predicting the phenotypic consequences of some types of chromosomal rearrangements remains difficult, partially owing to our incomplete knowledge of genes that are haploinsufficient (in which half a dose is detrimental) or dosage sensitive (in which both increased and decreased gene dose is detrimental) [11]. Therefore, the use of combined molecular analytic tools is necessary to delineate the entire range of variation that is associated with a particular chromosomal structural rearrangement in an individual personal genome. New mechanistic discoveries in humans are elucidating how the formation of chromosomal structural rearrangements can re-structure a specific region of the genome to change gene expression either locally or genome-wide [12,13] with pathological consequences for carriers [14].

Structural features of particular genomic regions can trigger the formation of recurrent and non-recurrent chromosome rearrangements, including chromosomal deletions and duplications. Those can be either interstitial or terminal. An interstitial chromosome deletion or duplication refers to the lost or gain of a segment of DNA in the middle of a chromosome.

A terminal deletion or duplication refers to a region that is from the telomere of either short arm or the long arm of a chromosome to a region lost/gain within the chromosome. Recurrent rearrangements share a common genomic size with clustered breakpoints and non-recurrent rearrangements visible by light microscopy distributed throughout the genome, have different sizes and distinct breakpoint combinations. Although there is some overlap, the two groups of structural abnormality display clear differences in how and when they arise [15].

For recurrent rearrangements, the predominant mechanism is nonallelic homologous recombination (NAHR) mediated by low copy repeats (LCRs, also called segmental duplications or SDs) [16]. NAHR is a reciprocal process resulting in the gain or loss of the genomic region flanked by the LCRs and is responsible for a large number of genomic disorders including eg, DiGeorge syndrome (DGS) and Williams-Beuren (WBS). NAHR may involve both chromosome homologues (interchromosomal) or separate chromatids of only a single chromosome (intrachromosomal). An interchromosomal origin is likely to indicate a meiotic event while an intrachromosomal origin may be either meiotic or mitotic [16;17;18]. Recurrent microdeletions and microduplications are mainly interchromosomal and are assumed to arise at meiosis [17,18]. Although more frequent, the formation of non-recurrent rearrangements is less well understood. Among cytogenetically visible deletions and duplications, there appear to be approximately equal numbers of interchromosomal and intrachromosomal abnormalities although only relatively small numbers have been investigated [19]. Until recently, it was assumed that most non-recurrent imbalances arise through non-homologous end joining (NEHJ), a process that joins double-stranded breaks in the absence of extensive sequence homology [16]. However, alternative mechanisms have been proposed such as fork stalling and template switching (FoSTes) [8] and microhomology-mediated breakpoint-induced replication (MMBIR) [20]. These are mitotic mechanisms based on stalling of the replication fork during DNA replication.

Improvements in classical and molecular cytogenetic techniques over the past 40 years have allowed an increasingly sensitive detection of chromosomal rearrangements, including deletions and duplications related to genomic disorders [21]. Cytogenetic and cytogenomic methods that can be combined in the routine analysis, include karyotyping, fluorescence *in situ* hybridization(FISH), array comparative genomic hybridization (aCGH) and SNP arrays [22].

Therefore, the aim of this study was to characterize interstitial chromosomal segmental deletions or duplications. In addition, this study explores the types of genomic rearrangements leading to such imbalances and the contribution of cytogenomic methodologies to further characterize chromosomal structural rearrangements in the clinical practice.

MATERIAL AND METHODS

Sample selection

This retrospective study was performed using DNA extracted from blood samples of four subjects with multiple congenital abnormalities (MCAs) and interstitial structural imbalances investigated at the Clinical Genetics section, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), Brazil. The Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV) is a regional pediatric referral center for the state of Rio Grande do Sul, in South Brazil. Venipuncture was used to collect 5 ml of blood from each patient. The Lahiri and Nurnberg method was used for DNA extraction. In cases for which the collection of a new blood sample was necessary, DNA extraction was performed with a Pure Link Genomic DNA kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The subjects were between 8 months and 11 years of age at the time of blood collection, and the patients' clinical and laboratory data from their first referrals were collected from the hospital's records. The data did not include follow-up investigations or disease outcomes. The study was carried out with four samples with interstitial structural rearrangements. Of the four samples, three samples with deletions and one sample with a duplication. All patients guardians provided informed consent before their inclusion in the study. Parental studies were performed, to determine whether the findings represent de novo or familiar events. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee and was conducted in accordance with current institutional ethics rules regarding the use of biological materials from biorepositories [23].

Molecular and classical cytogenetic studies

Peripheral blood lymphocytes from patient and the parents were cultured for 72 h according to standard procedures. Cytogenetic analysis was performed on GTG-banded chromosomes, and 20 cells from the patients and 20 cells of each parent were fully investigated.

For chromosomes that were found by karyotype to be rearranged, centromere or locus-specific probes were hybridized to metaphases and interphases of the patients and the parents. FISH experiments were carried out by standard techniques in all cases using commercially available locus-specific probes and centromeric-probes (Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois, EUA and Cytocell, Cambridge) for the following regions: 8q24.1 (GSDMC); 8q24.21

(MYC); 18p11.32 (subtelomere 18p); 18p11.1q11.1 (D18Z1); 18q21.3 (BCL2); 18q23(subtelomere 18q).

Hybridizations were analyzed with an epifluorescence microscope, and images were captured with a charged-couple device camera. At least 30 cells were analyzed per hybridization. We considered a chromosome region deleted when the FISH signal from the corresponding probe was absent from one of the homologous chromosomes. A chromosome duplication region was considered when at least three signals from the corresponding probe were observed.

Array comparative genomic hybridization (array-CGH)

We performed comparative genomic analysis with oligonucleotide array-based CGH using an 8x60K whole-genome platform (design 021924, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America), with an average distance of 40 kb between probes. Genomic DNA was isolated from the peripheral blood of four subjects (available at the biorepository) and subsequently analyzed. For each experiment, a gender-mismatched normal reference (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. The experiments were performed according to the manufacturer's protocol. Images of the arrays were taken using a microarray scanner (G2600D) and processed using the Feature Extraction software (v 9.5.1), both from Agilent. For the measurement of data quality, various quality control (QC) parameters have been employed, and included in software packages both from commercial sources and from the public domain. These QC parameters calculate microarray data noise, an appreciation which is critical to some assessments, like false discovery rate. For those CGH arrays manufactured by Agilent Technologies, as used in our study, the major QC parameter is known as the derivative log ration, or DLR. In our study DLR values of <0.15 were indicative of acceptable data. The raw data were analyzed using the Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 software and the ADM-2 statistical algorithm (second generation algorithm that can assist in controlling noise source), with a threshold of 6.0 and a 4-probe minimum aberration call. Subsequent normalization of the data was performed using the software to verify changes in DNA copy number. The P-values for each probe were calculated, providing additional objective statistical criteria to determine if each probe's deviation from zero was statistically significant. All experiments included two array hybridizations per sample, and the results were recorded and compared. To exclude false positive results, we confirmed the detected deletions and

duplications using dye-swap experiments. Laboratory personnel were blinded until test results became available. Array-CGH detected all known regions of genomic imbalance in the four validation samples with 100% concordance and an excellent signal-to-noise ratio (<0.1). Only genomic imbalances that were detected in both dye-swap experiments were reported.

Array-CGH and genomic data analysis

Whole-genome array-CGH data analysis was performed in a blinded fashion. Specifically, the samples were obtained, the identifying information was removed, and the investigators who performed the array-CGH analyses were not aware of the prior clinical and/or laboratory information related to each sample. The deletions and duplications segments that were detected were compared with the losses and gains that had been reported in at least three publicly available online resources and in databases of chromosomal abnormalities and variants. Our own in-house database was also consulted. As a reference, we used public data from compiled, collaborative databases including the Clinical Genomic Resource (ClinGen) (<http://clinicalgenome.org/>); the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (Decipher) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>); the European Cytogeneticists Association's Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>); the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>); the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); and the University California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). A review of the genes and other loci mapped to the deleted and duplicated region was performed, using human genome databases, such as the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). The UCSC database was also used to look for the presence of LCRs in the breakpoint intervals mapped by array CGH. The breakpoint interval was defined by the maximum and minimum size of the deleted or duplicated region according to the array platform used and the density of probes in that genomic region.

For every imbalance, the UCSC database was also used to look for the presence of LCRs in the breakpoint intervals mapped by array CGH. The breakpoint interval was defined by the maximum and minimum size of the imbalance, and varied in size from 5 to 250 kb according to the array platform used and the density of probes in that genomic region. The origin of an imbalance was assumed to have been mediated by NAHR if paralogous LCRs

spanned all or a large proportion of both the breakpoint intervals, while an imbalance was assumed to have arisen by a mechanism other than the NAHR if LCRs were absent from the breakpoint intervals. The orientation of the LCR was not taken into consideration.

RESULTS AND DISCUSSION

The aim of this study was to retrospectively characterize interstitial chromosomal segmental deletions or duplications using cytogenomic methods in samples available from subjects with multiple congenital abnormalities.

The data of the chromosomal structural rearrangements associated with congenital anomalies, whose cells in suspension and DNA samples were analyzed, are presented in Table 1. This study characterized three cases with interstitial deletions (del3q11.2-q13.31; del6p24.3-p22.3; del18q21.2-q23) and one case with an interstitial duplication (dup8q24.13-q24.3). From those cases, three were female and one was male. The details of the array-CGH results from the genomic imbalances identified are summarized in Table 1. The extension of the deletions and duplications analyzed ranged between 9.62 Mb (del6p24.3-p22.3), 16.44 Mb (del3q11.2-q13.31), 17.18 Mb (dup8q24.13-q24.3) and 26.61 Mb (del18q21.2-q23). Overall, two *de novo* deletions were verified (del6p24.3-p22.3; del18q21.2-q23) and further inherited deletion and inherited duplication were verified in two of the samples (del3q11.2-q13.31 and dup8q24.13-q24.3). Additionally, a FISH test confirmed the array-CGH results in two samples from which stored cells were available (Figures 3D,E and Fig. 4C).

Among the three samples with deletions, one case exhibited a visible cytogenetically interstitial deletion of chromosome 3 involving the proximal segment of chromosome 3 at bands q11.2 initially identified through G-banding (Figure 1A). The paternal karyotype was normal. The deletion was identified as inherited from the mother, whom had the same deletion detected through karyotype analysis (data not shown). The precise characterization of the deletion using oligonucleotide aCGH in both, child and mother, showed a gain of genomic material corresponding to an interstitial deletion in the long arm of chromosome 3, segment 3q11.2-q13.31, of approximately 16.44 Mb (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38). Arr 3q11.2-q13.31 (97,791,743-114,234,782) ×1 (Fig.1B). It is evident already from the karyotype analysis that a large chromosome deletion must involve many genes and be causally related to the congenital anomalies observed in both, the proband and the mother.

The proband at the age of 6 years presented at the clinical evaluation, microcephaly, oblique palpebral fissures upward, broad nasal root, bulbous nasal tip, high palate, cholestasis, patent ductus arteriosus and speech delay (Table 1). Her mother at the age of 28 years has ocular hypertelorism, oblique palpebral fissures upward, midfacial hypoplasia, hypoplasia of nose wings, missing teeth (she said teeth were changed and made use of denture since 15 years old), triangular neck, narrow thorax, lumbar concavity and fingernails with subungual detachment and learning difficulties.

Although the phenotypic features related to sample 1 is within the spectrum of the clinical features associated with partial or entire deletions of the 3q11.2-q13.31 region, most of the cases present intellectual disability, speech delay and epicanthus with no case of cholestasis associated reported. The cholestasis finding associated with the sample 1 was firstly suggestive of the diagnosis of α -1-antitrypsin deficiency (AATD) [24], a condition with an autosomal codominant pattern that may cause lung disease and liver disease affecting about 1 in 1,500 to 3,500 individuals with European ancestry. Thus, in this situation, other genetic variant along with this deletion is probable contributing to variable expressivity and penetrance observed in this family. Unfortunately, maternal DNA was not available to assess further characterization of the deletion segregating in this family. Bridging the knowledge between the inherited deletion identified here and phenotype requires more precise structural variant information and the identification of the elements that are responsible for the observed trait.

The contiguous deletion on chromosome 6p24.3 investigated in sample 2 was associated with dysmorphic features (Table 1) noted in a patient referred to the clinical genetics section at age of 8 months, including growth retardation, cerebral hypoplasia, microphthalmia and nystagmus (left eye), strabismus, submucosal cleft palate with unilateral cleft lip (right), severe micrognathia, atrial and ventricular septal defect and unilateral clubfoot (left). The interstitial deletion spans 9.62 Mb from 6p24.3 to p22.3 [Fig. 2B]. Array 6p24.3-p22.3 (9,734,048-19,355,673) \times 1. This region contain more than 29 genes, including TFAP2A(implicated in Branchio-Oculo-Facial Syndrome [25,26,27] and partially OFC1 (Orfacial Cleft 1) genetic locus. Branchio-oculo-facial syndrome (BOFS, OMIM# 113620) is a rare autosomal dominant disorder characterized by branchial cleft sinus defects, ocular anomalies and facial dysmorphisms, including lip or palate cleft or pseudocleft, and is associated with mutations in the TFAP2A gene.

In most cases reported, the mutations involving TFPA2A result in BOFs and only sporadic cases show cryptic chromosome aberrations. Dumitrescu [28], detected a 3.2 Mb cryptic chromosomal deletion in an affected mother and her son with BOFS at chromosome

6p24.3. These genomic alterations, even when found in a small percentage of cases, can significantly narrow the candidate region and allow successful discovery of the candidate genes. Although we report a larger deletion of 9.62 Mb involving TFPA2A and other contiguous genes as well as, probable TFPA2A gene is responsible for many aspects of the phenotype associated with the del6p24.3-p22.3 evaluated in this work.

A previous karyotype analysis of sample 3 revealed the presence of a suggestive terminal deletion on the long arm of chromosome 18 (Fig. 3A). The parents of the index case had a normal karyotype, FISH and array-CGH analyses (data not shown). Array-CGH analysis from the proband allowed for additional genomic information regarding the previously identified deletion and the characterization of an interstitial deletion spanning 26.61 Mb in the long arm of chromosome 18, segment q21.2-q23 (Figure 3B). Array 18q21.2-q23 (52,475,229-78,858,446) $\times 1$. FISH analysis with the BCL2/18q21.33 region probe confirmed the deletion of the critical region identified by array-CGH (Figure 3D). Furthermore, FISH with the 18 centromere/D18Z1 probe, subtelomere/18p11.32 probe and subtelomere 18q/18q23 probe revealed the occurrence of an inversion of the long arm of chromosome 18 (Figure 3E). FISH analyses of the parental chromosomes revealed normal result with the same FISH probes used, thus excluding a familial deletion and/or inversion of the corresponding region (data not shown).

The patient with del18q21.2-q23 was referred to the clinical genetics department at age of 3 years. Dysmorphic features were noted (Table1), including microcephaly, cerebral hypoplasia, bitemporal narrowing, epicanthus, long thumbs, sacral dimple and hypotonia. She had psychomotor and speech delay and stereotyped movements. Together, the clinical and cytogenetic evaluation suggested the patient's has the Pitt-Hopkins syndrome [29]. Pitt-Hopkins syndrome (PTHS, MIM #610954) is caused by haploinsufficiency of the TCF4 gene at 18q21.2 due to deletions, stop, splice-site and, less frequently, missense mutations which occur *de novo*.

PTHS is characterized by severe intellectual disability, typical facial features and tendency to epilepsy, panting-and-holding breathing anomaly, stereotypic movements, constipation, and high grade myopia. Growth is normal or only mildly retarded, but half of the patients have postnatal microcephaly. The cause of PTHS is *de novo* haploinsufficiency of the TCF4 gene (MIM * 602272) at 18q21.2. PTHS is not extremely rare among patients with severe intellectual disability. During a study period of 17 months, Rosenfeld [30] screened 13,186 samples from intellectually disabled individuals by array-CGH, and they found 7 persons carrying a deletion which included the whole of or a part of the TCF4 gene. From these

results, it was estimated that the frequency of PTHS caused by microdeletion is 1/34,000–1/41,000 in Washington, USA. The true prevalence of PTHS should be higher, as many cases are caused by point mutations.

At present, there is no evident phenotype-genotype correlation as regards the intragenic deletions or point mutations of the TCF4 gene [31]. In the 18q deletion patients, hemizygosity for TCF4 appears to confer a major impact with regard to motor and cognitive development: in one study, children with larger regions of hemizygosity as the one reported here, including as several contiguous genes, were not more developmentally delayed than children with hemizygosity for the TCF4 gene alone [32]. In contrast, patients, with large deletions but haplosufficient for TCF4 had milder symptoms and longer survival. Hemizygosity for TCF4 confers a significant impact primarily with regard to cognitive and motor development, resulting in a very different prognosis for individuals hemizygous for TCF4 when compared to individuals hemizygous for other regions of distal 18q segment.

With regard to cytogenetic and molecular examinations of sample 4, the duplication was initially identified through G-banding. The karyotype was interpreted as 46,XY,dup(8)(q24). The precise characterization of the deletion using oligonucleotide aCGH showed a loss of genomic material corresponding to an interstitial duplication in the long arm of chromosome 8, segment q24.13-q24.3, of approximately 17.18 Mb (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38). Arr 8q24.13-q24.3 (125,385,074 - 142,496,610) ×3 (Figure 4). Furthermore, FISH with MYC/8q24.21 probe and GSDMC/8q24.1 probe confirmed the duplication identified by array-CGH revealing also the occurrence of an inversion of the long arm of chromosome 8 (Figure. 4D). G-banding and FISH analyses of the paternal chromosomes revealed normal results. However, the maternal karyotype showed the same chromosome banding pattern of the patient, revealing the same duplication of the chromosome 8 as the child (data not shown). FISH analysis using probes MYC/8q24.21 and GSDMC/8q24.1 showed an inverted duplication on the abnormal 8 chromosome as well.

When the duplicated segment of breakpoints fall within the coding sequence, and duplication is in tandem, the duplicated material is in direct orientation to the original copy. In these cases there is still likely to two reading frames intact and open to the affected gene, with a third reading frame interrupted. This is less likely to result in clinical consequence. However, if the duplicated material is inverted, there must be only one intact open reading frame and increasing the probability of a clinical consequence due to haploinsufficiency of the disrupted gene [33].

Duplications detected by genomic microarray present unique considerations, such as location, orientation, and breakpoints of the additional copy of genomic material (Fig 4). Most interstitial duplications are tandem and in direct orientation in relation to the original locus. However, the location of the additional material may itself require consideration. FISH with a probe in the duplicated region can often show the genomic location of the additional material, and support either a tandem duplication or inversion duplication event, as we have seen in sample 4 (Fig. 4). The only inverted duplications are those that are part of more complex rearrangements, including insertional translocations and inverted duplications adjacent to terminal deletions [34].

Interstitial duplications are often inherited from parents. In our study, the interstitial duplication characterized is maternal in origin. The mother had medical history of cleft lip and palate, not observed in his son. Thus, predicting outcomes for future pregnancies complicated by incomplete penetrance and variable expressivity that can occur in individuals of the same family, complicating the genetic counselling. The highly variable nature of the genome means that care must be taken in assigning pathogenicity to inherited chromosomal rearrangements. Regarding the cleft lip and palate described in the mother, we shall consider that approximately 30% of cleft lip and palate cases and 50% of cleft palate cases are recognized as components of MCA syndromes [35]. However, both genetic and environmental factors are known to contribute to the occurrence of cleft lip and palate, complicating the elucidation of the causative mechanisms. Considerable efforts have been made in seeking candidate gene(s) for non-syndromic clefts through array-CGH, showing that it is an effective method for isolating candidate loci [36,37].

Currently, the molecular detection of structural chromosome rearrangements in individuals with MCA as well as in affected parents, is prone to diagnostic pitfalls due to difficulties in interpretation, as already revised in other structural variant studies [11]. Most chromosomal abnormalities have clinical effects; however, some genomic rearrangements often display variable expressivity and penetrance [38,39]. Using combined analytic tools is necessary to delineate the entire range of variation that is associated with a particular structural rearrangement in an individual personal genome.

To clinically manage situation with inherited chromosomal rearrangements it is essential to have the most accurate and up-to-date information on the clinical significance of known genomic deletions and duplications, pathogenic mutations, polymorphisms and non-genetic factors that may lead to a disease trait. Further consultations at genetics clinics and extended analysis of family members may be necessary to provide accurate clinical

examinations, genetic counseling and calculation of the recurrence risk of chromosome rearrangements.

We report here two interstitial deletions, one inherited (del3q11.2q13.31) and one *de novo* (del6p24.3p22.3) visible cytogenetically. The introduction of array CGH has enabled previously unrecognized imbalances to be investigated. Array CGH can define precisely the size of a larger or small imbalance allowing the presence of LCRs at the breakpoints to be investigated. This makes it possible to distinguish rearrangements formed by NAHR from rearrangements formed by the other mechanisms. Many factors contribute to the formation of genomic structural rearrangements [40]. The formation of recurrent microdeletion/ duplication syndromes is mediated by non-allelic homologous recombination (NAHR) mediated by low copy repeats (LCRs), predominantly during meiosis [16]. We assumed that an imbalance to have been mediated by NAHR if paralogous LCRs spanned all or a large proportion of both the breakpoint intervals of a chromosome rearrangement, while an imbalance was assumed to have arisen by a mechanism other than the NAHR if LCRs were absent from the breakpoint intervals. For the two simple larger imbalances described here, an LCR was present at only one breakpoint interval and these were also assumed to have arisen by a mechanism other than the NAHR. This is in agreement with the formation of non-recurrent chromosome imbalances, which appears to be much more heterogeneous.

Samples 3 and 4 presented inversions associated with segmental deletion and duplication, respectively. In both cases genomic imbalances could not be diagnosed neither by classical cytogenetic studies nor by array-CGH. The event of inversion could be identified only after the fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis using locus-specific probes within for the critical segments (Figures 3C and 4C). Genomic microarray can identify copy number changes, as deletions and duplications, but it does not show further structural rearrangements, as inversions or balanced translocations. In some chromosomal structural rearrangements, as the inversion/deletion and inversion/duplication observed in our study, only FISH analysis can further characterize an imbalance detected.

It is also possible for multiple chromosome alterations to exist in one individual. The cytogenetic recognition of one alteration may satisfy the inquiry for the etiology of the patient's phenotype; however, a higher resolution analysis may reveal an unexpected additional alteration that has clinical significance or another relevant structural rearrangement. Examples include the initial interpretation of a direct terminal deletion, as assumed firstly in sample 3 (del18q21.2-q23) or direct duplication, as previously assumed in sample 4 (dup824.13-q24.3) which then by FISH analysis shows both an unsuspected inversion. In both events of

inversion/deletion and inversion/duplication reported here, it could be suggested that the lack of homology across the inversion region between heterozygous chromatids in meiosis may lead to the formation of an “asynaptic bubble” that renders the region unstable and prone to additional rearrangements [41].

The clinical cases presented here could not be determined only by the clinical examination. In general, the phenotypic characteristics of well-defined deletion/duplication chromosomal rearrangements associated with MCA with or without intellectual disabilities are often, clinically detected before the causal structural rearrangements are identified [42]. However, the clinical evaluation of individuals with such syndromes continues to challenge clinicians and requires a high degree of experience and expertise. Although some diagnostic steps are highly standardized (for example, database searches, clinical utility gene cards, and standard clinical scores), others are not suitable for standardization.

Moreover, the diagnosis of interstitial deletions and duplications as reported in our study, using only clinical assessment may be difficult because of the great variability in the symptoms, especially in relation to the size of the genomic imbalance and the expertise of the clinician. In contrast to single gene disorders, contiguous gene deletions and duplications, and especially those resulting in developmental delays, intellectual disabilities or congenital developmental abnormalities, are caused by structural chromosomal rearrangements that encompass several genes; generally, at least two of these genes are dosage-sensitive but functionally unrelated. There are also some features that do not become distinct until a certain age, at which time a particular behavior or clinical manifestation presents. Because of the growing number of recognized genetic syndromes and chromosome abnormalities, and because of the overlapping clinical characteristics of carriers of segmental deletions and duplications, it is becoming increasingly difficult to use only the clinical examination to determine exactly which syndrome affects an individual who carries a chromosomal structural rearrangement.

Although considerable improvements have recently been made in mapping structural rearrangements and interpreting their functional impact, numerous important challenges remain. The characterization of the critical region related to specific congenital defects depends also on the quality of the phenotyping, the local practice and the availability of funding. For example, in this study, we should consider the prior subjects' limited access to appropriate cytogenomic studies and care, which is the case in most regions in low- and middle-income countries [43].

CONCLUSIONS

In conclusion, our study has shown that combined cytogenomic methods can be successfully used to characterize genomic imbalances in individuals with interstitial deletions and duplications associated with malformation syndromes in the clinical practice. The use of retrospective or prospective cytogenomic analysis of chromosomal structural rearrangements as a diagnostic tool would benefit families by providing a more accurate diagnosis and would affect overall disease management in a significant number of cases. Indeed, it is important to report cytogenetic data when characterizing structural rearrangements because some of the data may represent recurrent genomic imbalances that could be associated with a specific syndrome not yet classified. Reports of subjects with similar genomic imbalances, as well as clinical findings, may also lead to the identification of newly recognized genomic disorders or candidate genes. Furthermore, the results of such studies emphasize the growing importance of the use of a combination of technologies for both the identification and characterization of segmental deletions and duplications, thereby increasing the understanding on the dynamic nature of chromosome structure and its relationship to genomic diseases. The technology used to study genomic structural rearrangements has also rapidly expanded, and the number of genomic rearrangements in the human genome are likely unlimited. Therefore, comprehensive characterization of structural rearrangements through various approaches represents a major challenge to the understanding of how chromosome imbalances arise.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grant 476783/2013-5) and to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil, 01/2013) for the financial support received.

Table 1. Details of the genomic imbalances analyzed in patients with interstitial chromosome rearrangements

case	Gender/age*	Del/Du P	Chromosome Region	Orientation	Genomic coordinates (hg 19)	Size (Mb)	origin	Associated Clinical features*
1	F/6 y	del	3q11.2-q13.31	dir	97,791,743-114,234,782	16.44	mat	microcephaly, up-slanting and oblique palpebral fissures, broad nasal root, bulbous nasal tip, high palate, astigmatism, patent ductus arteriosus , cholestasis, speech delay.
2	F/8m	del	6p24.3-p22.3	dir	9,734,048-19,355,673	9.62	dn	growth retardation, cerebral hypoplasia, microphthalmia and nystagmus (left eye), strabismus, submucosal cleft palate with unilateral cleft lip (right), severe micrognathia , atrial and ventricular septal defect, clubfoot (left).
3	F/3y	del	18q21.2-q23	inv	52,475,229-78,858,446	26.61	dn	growth retardation, microcephaly, cerebral hypoplasia, bitemporal narrowing, epicanthus, long thumbs, sacral dimple, hypotonia, psychomotor and speech delay, stereotyped movements.
4	M/8 y	dup	8q24.13-q24.3	inv	125,385,074 -142,496,610	17.18	mat	microcephaly, low-set hair on the forehead, long eyelashes, micrognathia, hemangioma in the the lower lip, seizures, speech delay.

*age at the time of clinical evaluation; del: deletion; dir: direct; dn: *de novo*; dup: duplication; inv: inverted; F: female; M: male; m:months; y:years; mat:maternal

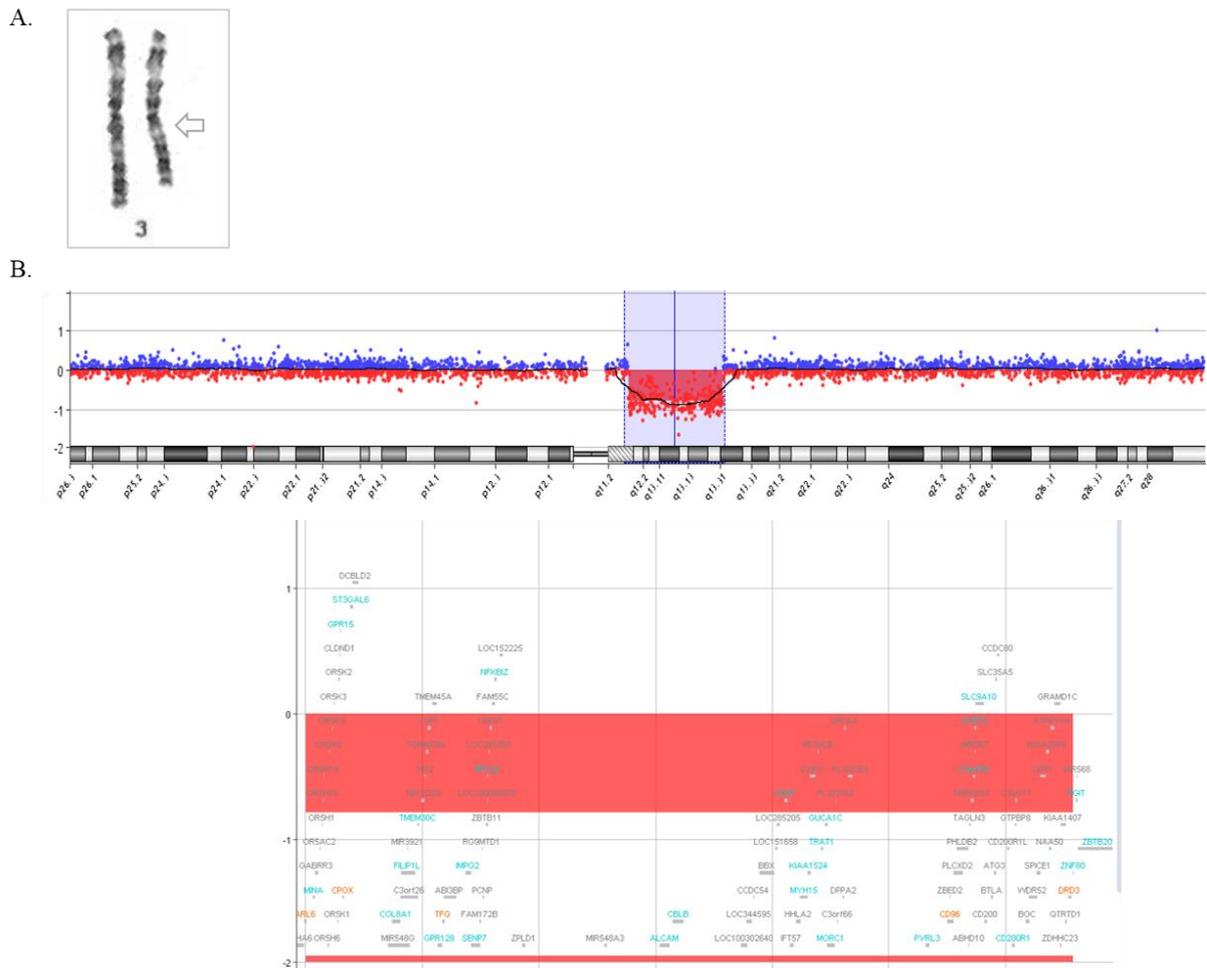


Figure 1. (A): chromosome banding shows an interstitial deletion on chromosome 3q11.2. (B): Array-CGH ratio profiles of chromosome 3q11.2-q13.31 using genomic DNA from the patient as a test (red) and DNA from normal subjects as a reference (blue). The test/reference ratio data for the chromosome 3 is shown. Each dot represents a single probe (oligo) spotted on the array. The log ratio of the chromosome probes is plotted as a function of chromosomal position. A copy number loss shifts the ratio downward (approximately $-1x$). The ideogram of chromosome 3 profile shows the location of each probe. The probe log₂ ratios were plotted according to genomic coordinates (based on the UCSC Genome Browser, December 2013, NCBI Build 38 reference sequence). Top, chromosome 3 array-CGH profile indicating the interstitial deletion on the long arm (blue box); bottom, detail of the 3q11.2-q13.31 gene region showing the deletion of approximately 16.44-Mb from sample 1 (red line).

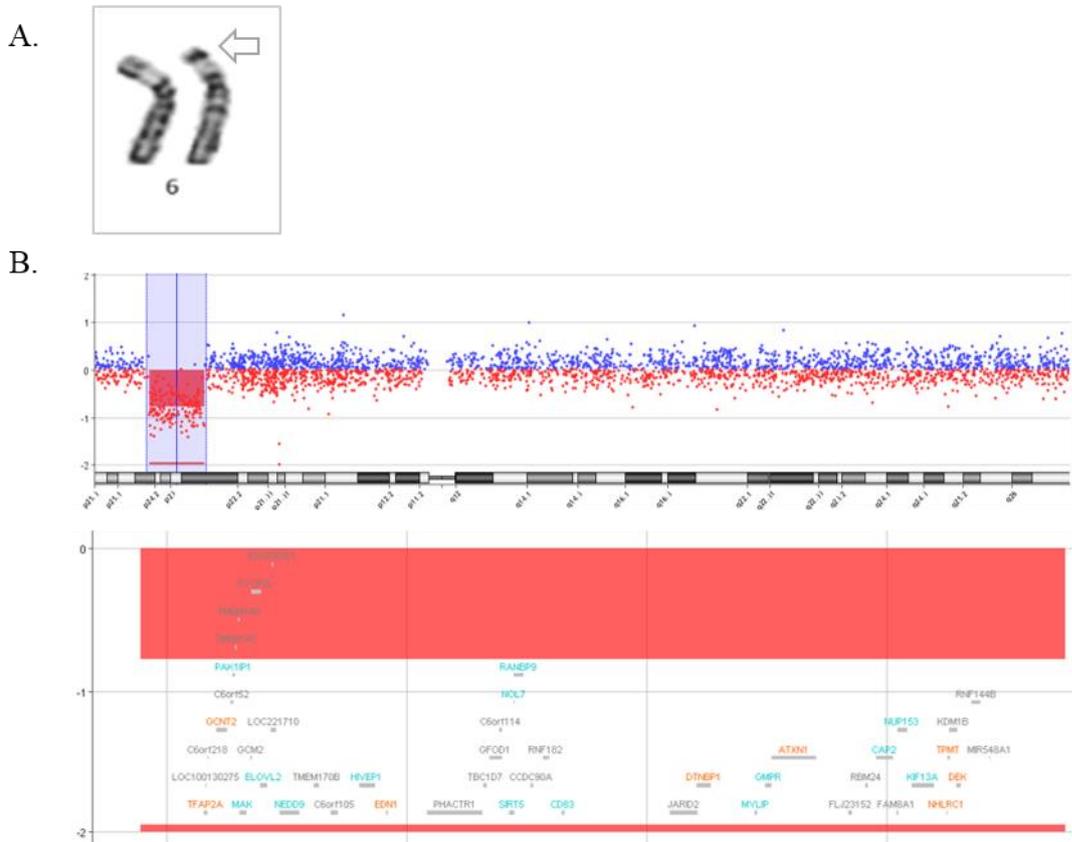


Figure 2. (A): chromosome banding shows an interstitial deletion on chromosome 6p24. (B) Array-CGH ratio profiles of chromosome 6p24.3-p22.3 using genomic DNA from the patient as a test (red) and DNA from normal subjects as a reference (blue). The test/reference ratio data for the chromosome 6 is shown. Each dot represents a single probe (oligo) spotted on the array. The log ratio of the chromosome probes is plotted as a function of chromosomal position. A copy number loss shifts the ratio downward (approximately $-1x$). The ideogram of chromosome 6 profile shows the location of each probe. The probe \log_2 ratios were plotted according to genomic coordinates (based on the UCSC Genome Browser, December 2013, NCBI Build 38 reference sequence). Top, chromosome 6 array-CGH profile indicating the interstitial deletion (blue box); Bottom, detail of the 6p24.3-p22.3 gene region showing the segment deletion of approximately 9.62-Mb from sample 2 (red line).

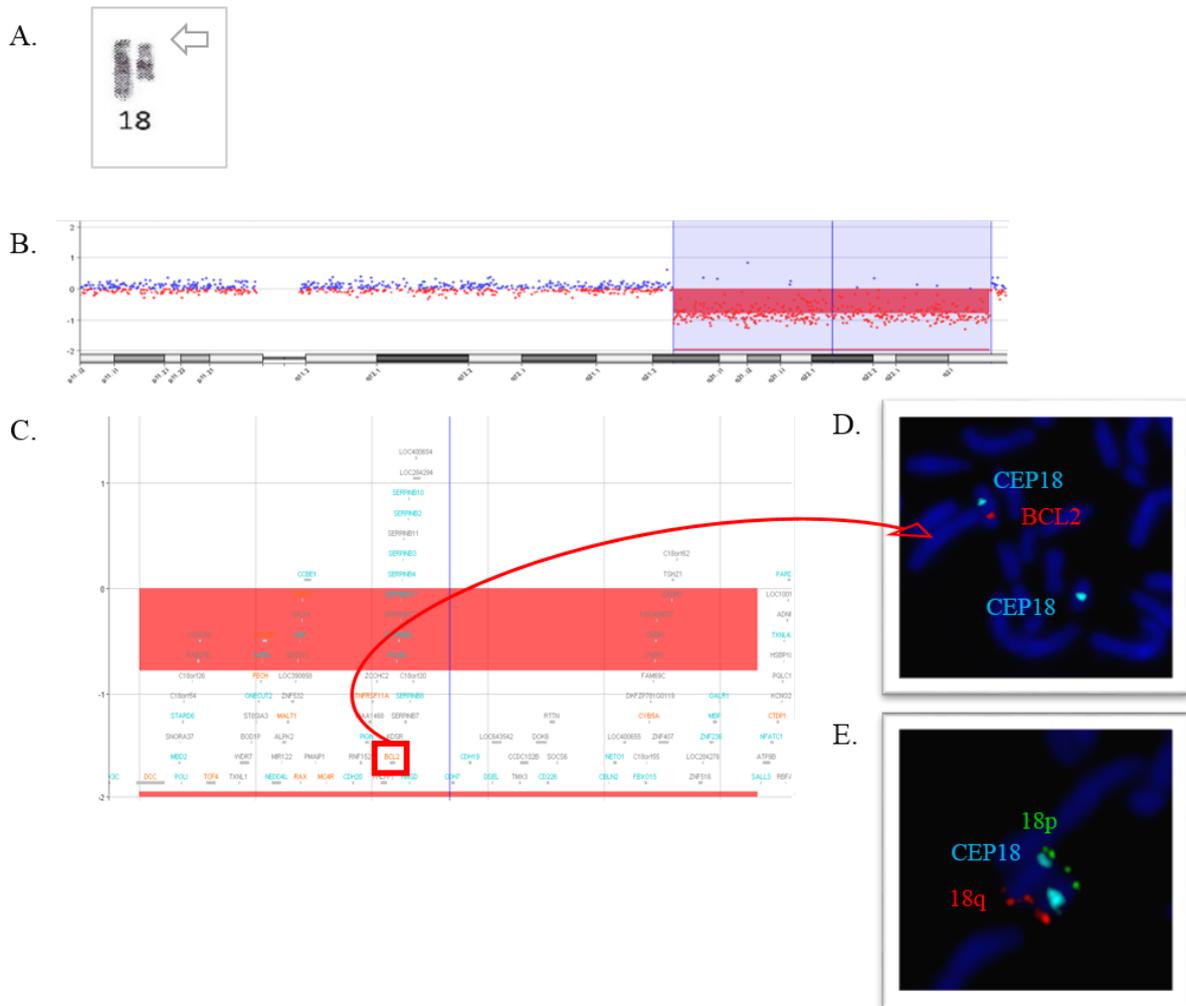


Figure 3. (A): chromosome banding shows a deletion on chromosome 18q21. (B) Chromosome 18 array-CGH profile indicating an interstitial deletion (blue box). The ideogram of chromosome 18 profile shows the location of each probe. The probe log₂ ratios were plotted according to genomic coordinates (based on the UCSC Genome Browser, December 2013, NCBI Build 38 reference sequence). (C) detail of the 18q21.2-q23 gene region showing the segment deletion of approximately 26.61-Mb from sample 3 (red line); (D) FISH with the 18 centromere/D18Z1 probe (aqua) and *BCL2*/18q21.33 region probe. The absence of the red signal on chromosome 18 homologue confirm the deletion of the critical region identified by array-CGH; (E) FISH with with the 18 centromere/D18Z1 (aqua signal), subtelomere/18p11.32 probe (green signal) and subtelomere 18q/18q23 probe (red signal) indicates the occurrence of an inversion of the long arm of chromosome 18 (localized on the right side). D; E: probe from Cytocell, Cytocell Ltd., Cambridge, UK. *BCL2*: B-Cell CLL/Lymphoma 2.

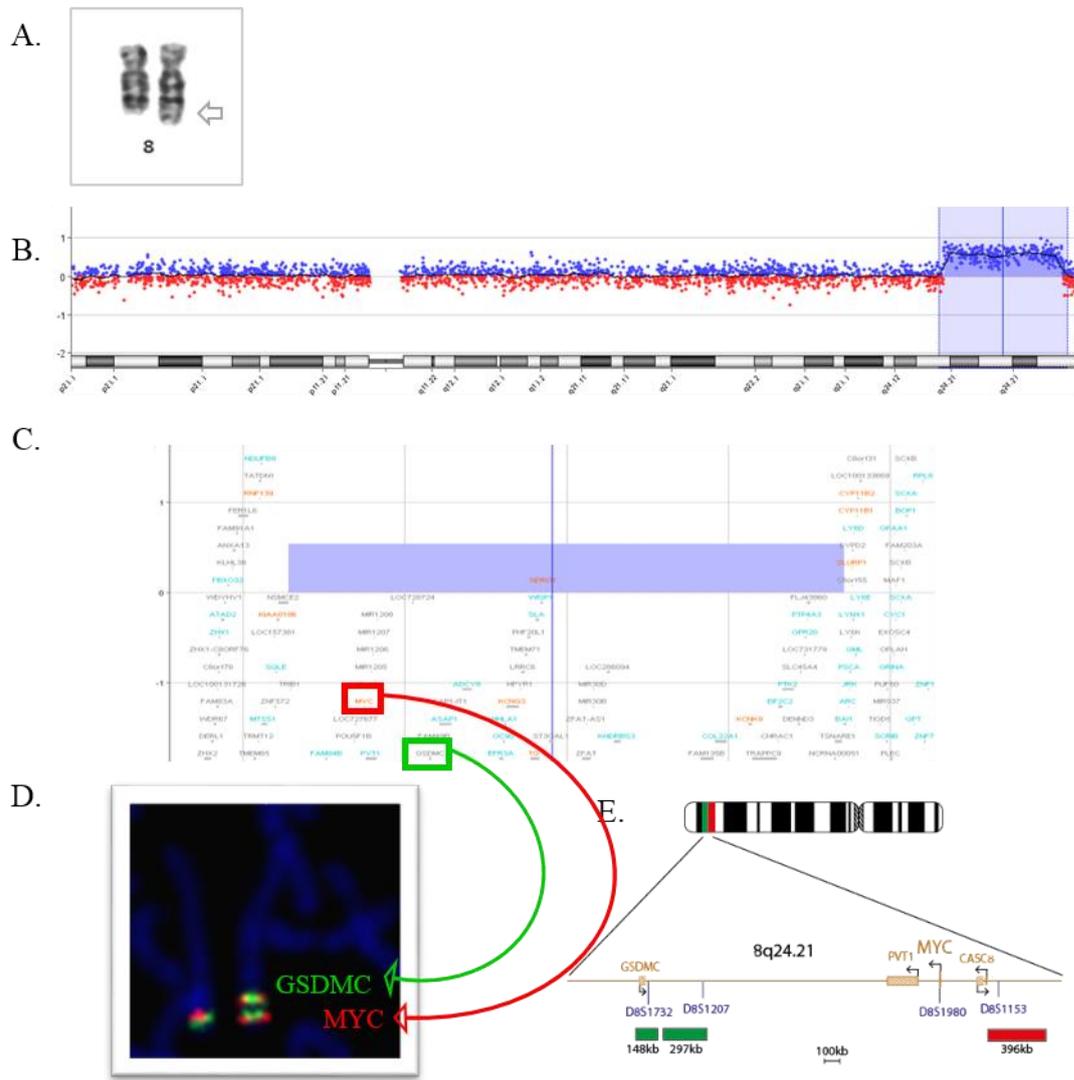


Figure 4. (A): chromosome banding shows an additional segment on the long arm of chromosome 8q24. (B) Array-CGH ratio profiles of chromosome 8q24.13-q24.3. The test/reference ratio data for the chromosome 8 is shown. A copy number gain shifts the ratio upward (approximately +1x). (C) detail of the 8q24.13-q24.3 gene region showing the segment duplication of approximately 14.75-Mb from sample 4 (blue line); (D) FISH with MYC/8q24.21 probe (red signal) and GSDMC/8q24.1 probe (green signal); (E) chromosome scheme showing the respective localization of the probes utilized in the FISH analysis. Probes from CytoCell, CytoCell Ltd., Cambridge, UK; *GSDMC* (Gasdermin C); *MYC* (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog).

REFERENCES

- [1] J. R. Lupski, P. Stankiewicz, "Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes," *PLoS Genetics*, vol. 1, no. 6, pp. 49, 2005.
- [2] S. Le Scouarnec, S. M. Gribble "Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics," *Heredity (Edinb)*, vol. 108, pp. 75-85, 2012.
- [3] B. B. Currall, C. Chiang, M. E. Talkowski, C. C. Morton, "Mechanisms for Structural Variation in the Human Genome," *Current Genetic Medicine Reports*, vol. 1, no. 2, pp. 81-90, 2013.
- [4] F. Zhang, C. M. Carvalho, J. R. Lupski, "Complex human chromosomal and genomic rearrangements," *Trends in Genetics*, vol. 25, no. 7, pp. 298-307, 2009.
- [5] P. Liu, A. Erez, S. C. Nagamani et al., "Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements," *Cell*, vol. 146, pp. 889–903, 2011.
- [6] W. P. Kloosterman, M. Tavakoli-Yaraki, M. J. van Roosmalen et al., "Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms," *Cell Reports*, vol. 1, no. 6, pp. 648-55, 2012.
- [7] A. J. Sharp, S. Hansen, R. R. Selzer et al., "Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome," *Nature Genetics*, vol. 38, no. 9, pp. 1038-42, 2006.
- [8] J. A. Lee, C. M. Carvalho, J. R. Lupski JR, "A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders," *Cell*, vol. 131, pp. 1235–1247, 2007.
- [9] G. J. Williams, S. P. Lees-Miller, J. A. Tainer, "Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks," *DNA Repair (Amst)*, vol. 9, no. 12, pp. 1299-306, 2010.
- [10] S. Girirajan, "Genomic disorders: complexity at multiple levels," *Genome Medicine*, vol. 5, no. 5, pp. 43, 2013.
- [11] J. Weischenfeldt, O. Symmons, F. Spitz et al., "Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease," *Nature Reviews Genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 125, 2013.
- [12] G. Ricard, J. Molina, J. Chrast et al., "Walz K. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models," *PLoS Biology*, vol. 8, no. 11, 2010.
- [13] N. Gheldof, R. M. Witwicki, E. Migliavacca et al., "Structural variation-associated expression changes are paralleled by chromatin architecture modifications," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, 2013.
- [14] D. G. Lupiáñez, K. Kraft, V. Heinrich et al., "Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions," *Cell*, vol. 161, pp. 1012–1025, 2015.
- [15] C. Sibbons, J. K. Morris, J. A. Crolla et al., "De novo deletions and duplications detected by array CGH: a study of parental origin in relation to mechanisms of formation and size of imbalance," *European Journal of Human Genetics*, vol. 20, no. 2, pp. 155-60, 2012.
- [16] W. Gu, F. Zhang, J. R. Lupski, "Review: mechanisms for human genomic rearrangements," *PathoGenetics*, vol. 1, no. 1, pp. 4, 2008.
- [17] A. Baumer, F. Dutly, D. Balmer et al., "High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions," *Human Molecular Genetics*, vol.7, pp. 887–894, 1998.

- [18] N. S. Thomas, M. Durkie, B. Van Zyl et al., "Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man". *Human Genetics*, vol. 119, pp. 444–450, 2006a.
- [19] N. S. Thomas, M. Durkie, G. Potts, "Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11," *European Journal of Human Genetics*, vol. 14, pp. 831–837, 2006b.
- [20] P. J. Hastings, G. Ira, J. R. Lupski, "A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation". *PLoS Genetics*, vol. 5, no.1, 2009.
- [21] J.R. Lupski, "Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits", *Trends Genetics*, vol.14, pp. 417–422, 1998.
- [22] M. Riegel, "Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 37(1 Suppl), pp. 194-209, 2014.
- [23] M. S. Fernandes, P. Ashton-Prolla, U. Matte et al., "TheHospital de Clinicas de Porto Alegre normative for the storage and use of human biological materials and their associated information in research: an interdisciplinary approach," *Revista HCPA*, vol. 30, pp. 169–179, 2010.
- [24] C.B. Laurell, S. Eriksson, "The electrophoretic pattern α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol.15, pp. 132–40, 1963.
- [25] J. M. Milunsky, T. A. Maher, G. Zhao et al., "TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome," *American Journal of Human Genetics*, vol. 82, no. 5, pp.1171-7, 2008.
- [26] J. M. Milunsky, T. M. Maher, G. Zhao et al., "Genotype-phenotype analysis of the branchio-oculo-facial syndrome," *American Journal of Medical Genetics Part A*, vol. 155A, no. 1, pp. 22-32, 2011.
- [27] T. I. Meshcheryakova, R. A. Zinchenko, T. A. Vasilyeva et al., "A clinical and molecular analysis of branchio-oculo-facial syndrome patients in Russia revealed new mutations in TFAP2A," *Annals of Human Genetics*, vol. 79, no. 2, pp. 148-52, 2015.
- [28] A. V. Dumitrescu, J. M. Milunsky, S. Q. Longmuir et al., "A family with branchio-oculo-facial syndrome with primarily ocular involvement associated with mutation of the TFAP2A gene," *Ophthalmic Genetics*, vol. 33, no. 2, pp. 100-6, 2012.
- [29] D. Pitt, I. Hopkins I, "A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing," *Australian Paediatric Journal*, vol. 14, no. 3, pp. 182-4, 1978.
- [30] J. A. Rosenfeld, K. Leppig, B. C. Ballif et al., "Genotype-phenotype analysis of TCF4 mutations causing Pitt-Hopkins syndrome shows increased seizure activity with missense mutations," *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, vol. 11, no. 11, pp. 797-805, 2009.
- [31] M. Peippo, J. Ignatius, "Pitt-Hopkins Syndrome," *Molecular Syndromology*, vol. 2, pp. 171-180, 2012.
- [32] G. Marangi, S. Ricciardi, D. Orteschi, "The Pitt-Hopkins syndrome: report of 16 new patients and clinical diagnostic criteria," *American Journal of Medical Genetics Part A*, vol. 155A, no. 7, pp. 1536-45, 2011.
- [33] T. S. South "Chromosomal Structural Rearrangements: Detection and Elucidation of Mechanisms Using Cytogenomic Technologies," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 31, pp. 513–524, 2011.
- [34] S. Newman, K. E. Hermetz, B. Weckselblatt et al., "Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 96, no. 2, pp. 208-20, 2015.

- [35] P. Stanier, G. E. Moore, "Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts," *Human Molecular Genetics*, vol. 13, pp. 73-81, 2004.
- [36] K. Osoegawa, G. M. Vessere, K. H. Utami et al., "Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation," *Journal of Medical Genetics*, vol. 45, pp. 81, 2008.
- [37] M. Shi, A. Mostowska, A. Jugessur et al., "Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate," *Birth defects research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, vol. 85, pp. 42-51, 2009.
- [38] L. Feuk, C. R. Marshall, R. F. Wintle et al., "Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies," *Human Molecular Genetics*, vol. 15, spec no. 1, pp. 57-66, 2006.
- [39] C. Lee, S. W. Scherer, "The clinical context of copy number variation in the human genome," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 9, pp. 12, 2010.
- [40] C. M. Carvalho, J. R. Lupski JR, "Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders," *Nature Reviews Genetics*, Feb 29, 2016.
- [41] A. J. Sharp, "Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease," *Human Mutation*, vol. 30, no. 2, pp. 135-44, 2009.
- [42] L. E. L. M. Vissers, P. Stankiewicz, "Microdeletion and microduplication syndromes," *Methods in Molecular Biology*, vol. 838, pp. 29-75, 2012.
- [43] World Health Organization, "Report 2014," <http://www.who.int/>.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS ADICIONAIS
Caracterização Citogenômica

5.1. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ESTRUTURAIIS

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

A escolha das regiões incluídas na pesquisa de alterações cromossômicas ou genômicas define sua classificação em dois tipos: o *array*-CGH representativo do genoma inteiro e as análises comparativas de genoma direcionadas para regiões específicas, geralmente envolvidas em rearranjos cromossômicos já descritos. Além da identificação das alterações cromossômicas detectáveis pela análise cromossômica convencional, a aplicação de *array*-CGH tem permitido a detecção da variação do número de cópias genômicas e a caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais. A detecção e o mapeamento de alterações do número de cópias de certas regiões do genoma oferecem uma importante contribuição para a associação entre os defeitos moleculares encontrados, o fenótipo dos indivíduos portadores e a determinação da origem dos desequilíbrios genômicos. Assim, os métodos de citogenética molecular tem sido largamente empregados no rastreamento ao longo do genoma de alterações genômicas que podem representar a evidência inicial para a identificação de um ou mais genes associados às doenças genômicas causadas por alterações cromossômicas estruturais.

A seguir, apresentamos a caracterização citogenômica de 5 rearranjos cromossômicos estruturais com desequilíbrios genômicos relevantes avaliados por este estudo.

Tabela 5.1. Resumo das características citogenômicas dos 5 rearranjos cromossômicos estruturais estudados.

Amostra	del/dup	Localização cromossômica	Tamanho (Mb)	Posição Genômica GRCh38/hg38 início-fim	Nº de genes OMIM	Origem	Principais característica clínicas
1	del intersticial	3q11.2-q13.31	16.44	97,791,743-114,234,782	55	mat	♀, 6 anos*, microcefalia, fendas palpebrais oblíquas para cima, raiz nasal larga, ponta nasal bulbosa, palato alto, colestase, persistência do canal arterial, atraso de linguagem
2	del intersticial	6p24.3-p22.3	9.62	9,734,048-19,355,673	29	dn	♀, 8 meses*, retardo de crescimento, hipoplasia cerebral, microftalmia e nistagmo do olho esquerdo, estrabismo, fissura de palato submucosa e lábio leporino a direita, micrognatia severa, comunicação interatrial e interventricular, pé torto à esquerda
3	inv del intersticial	18q21.2-q23	26.61	52,475,229-78,858,446	67	dn	♀, 3 anos*, retardo de crescimento, microcefalia, hipoplasia cerebral, estreitamento bitempotal, epicanto, polegares longos, fosseta sacral, hipotonia, atraso neuropsicomotor e de linguagem, movimentos estereotipados
4	inv dup intersticial	8q24.13-q24.3	17.18	125,385,074-142,496,610	32	mat	♂, 8 anos*, atraso de fala, microcefalia, cabelo de implantação baixa na fronte, cílios longos, micrognatia, hemangioma no lábio inferior à esquerda, crise convulsiva em vigência de febre.
5	dup terminal	18p11.32-p11.21	14.75	14,316-14,773,576	53	-	♂, 11 anos*, dificuldade de aprendizagem, atraso de linguagem, agitação psicomotora e ansiedade

*: na primeira avaliação clínica; ♀: feminino; ♂: masculino; "-": origem não determinada; del: deleção; dn: *de novo*; dup: duplicação; inv: inversão; mat: materna p: braço curto; q: braço longo; Mb: Megabase; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*.

5.2. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DA AMOSTRA #1 – del3q11.2-q13.31

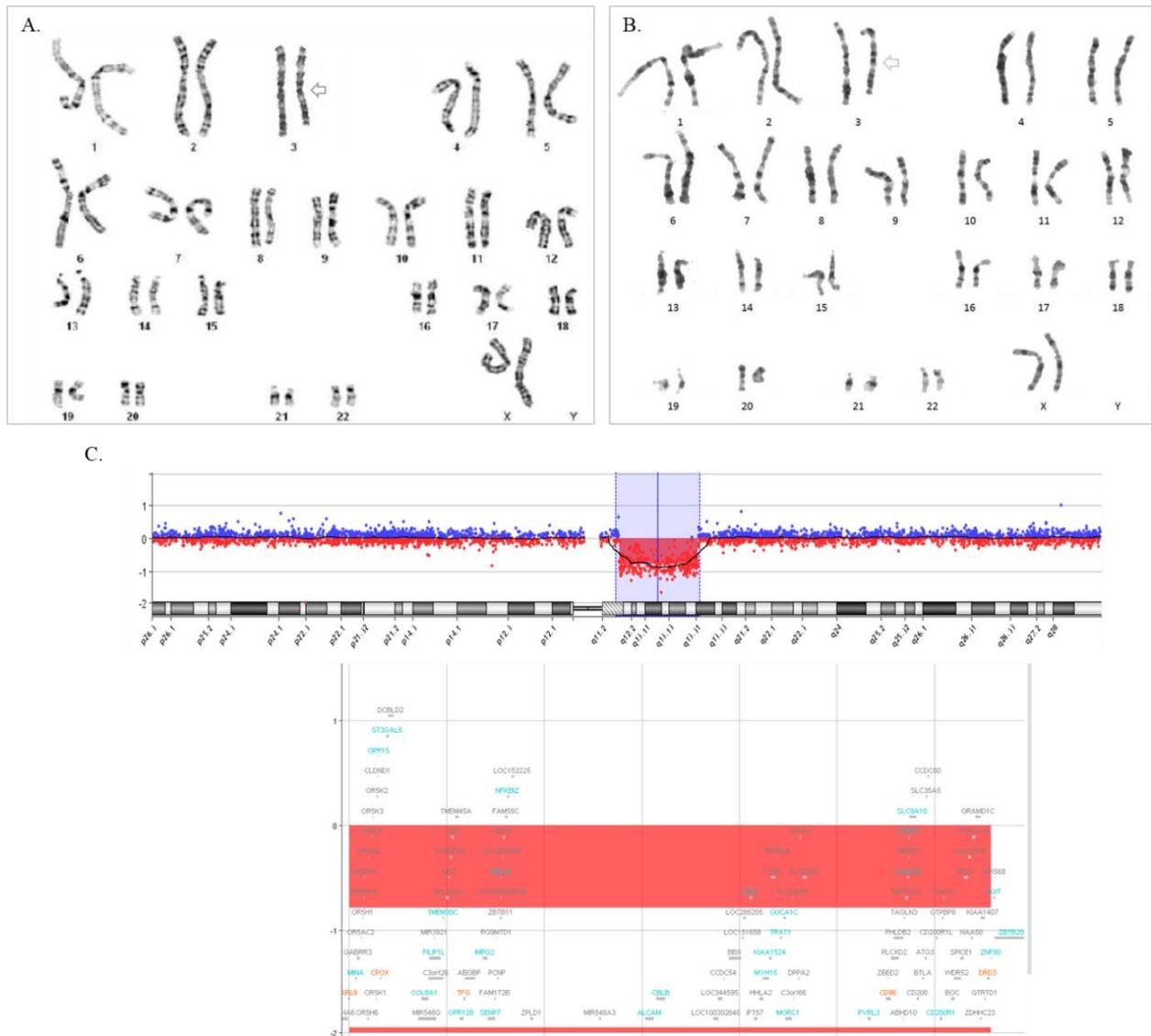


Figura 5.1: Cariótipo com bandamento GTG e representação do perfil cromossômico da amostra#1 com imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra o segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo em bandamento GTG evidencia uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 3 na região q11.2; (B) O cariótipo da mãe revelou a mesma deleção intersticial 3q11.2; (C) *array-CGH* mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 3q11.2-q13, de ~ 16.44 Mb de tamanho (chr3: 97,791,743-114,234,782).



Figura 5.2: (A) e (B): Paciente com $\text{del}(3)(q11.2-q13.31)$ que apresenta microcefalia, fendas palpebrais oblíquas para cima, raiz nasal larga, ponta nasal bulbosa, palato alto, colestase, persistência do canal arterial, atraso de linguagem; (C) Mãe da paciente, também com $\text{del}(3)(q11.2-q13.31)$.

Tabela 5.2. Caracterização genômica da região 3q11.2-q13.31.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
#1: del3q11.2-q13.31: 97,791,743-114,234,782	
ARL6 (<i>ADP-Ribosylation Factor-Like 6</i>)	Síndrome de Bardet-Biedl e Retinite pigmentosa/Envolvido no tráfico de proteína de membrana na base da organela ciliar.
MINA (<i>MYC Induced Nuclear Antigen</i>)	Oxigenase que pode atuar tanto como um desmetilase de lisina de histona e hidroxilase de histidina ribossomal.
GPR15 (<i>G Protein-Coupled Receptor 15</i>)	Osteossarcoma e HIV-1/Provável receptor de quimiocina e co-receptor alternativo com CD4 para infecção por HIV-1.
CPOX (<i>Coproporphyrinogen Oxidase</i>)	Porfíria mais difícil e coproporfíria hereditária/Enzima chave na biossíntese do grupamento heme.
ST3GAL6 (<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 6</i>)	Carcinoma inflamatório de mama e sialuria/Envolvidas na síntese de sialil-paragloboside, um precursor do sialil-Lewis X determinante.
DCBLD2 (<i>Discoidin, CUB And LCCL Domain Containing 2</i>)	-
COL8A1 (<i>Collagen, Type VIII, Alpha 1</i>)	Distrofia corneana posterior polimorfa e distrofia endotelial de Fuchs/Necessário para a migração e proliferação das células do músculo liso vascular.
FILIP1L (<i>Filamin A Interacting Protein 1-Like</i>)	Câncer de ovário/Age como um regulador da atividade anti-angiogénica em células endoteliais.
TMEM30C (<i>Transmembrane Protein 30C</i>)	-
TOMM70A (<i>Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 70 Homolog A</i>)	Receptor que acelera a importação de todas as proteínas precursoras mitocondriais (por semelhança).
GPR128 (<i>G Protein-Coupled Receptor 128</i>)	-
TFG (<i>TRK-Fused Gene</i>)	Neuropatia hereditária, paraplegia espástica, atrofia óptica/codifica uma proteína que desempenha um papel na função dinâmica normal do retículo endoplasmático (RE) e seus microtúbulos associados.
ABI3BP (<i>ABI Family, Member 3 (NESH) Binding Protein</i>)	Codifica uma proteína de 486 aminoácidos contendo um motivo de ligação SH3, uma sequência de direcionamento nuclear, e nenhum domínio catalítico.
IMPG2 (<i>Interphotoreceptor Matrix Proteoglycan 2</i>)	Maculopatia e retinite pigmentosa/Ligação à heparina e ácido hialurônico.
SEN7 (<i>SUMO1/Sentrin Specific Peptidase 7</i>)	Malária/Protease que desconjuga SUMO2 e SUMO3 de proteínas-alvo.
RG9MTD1 (<i>tRNA Methyltransferase 10 Homolog C</i>)	Funções na maturação de tRNA mitocondrial.
PCNP (<i>PEST Proteolytic Signal Containing Nuclear Protein</i>)	Pode estar envolvidos na regulação do ciclo celular
RPL24 (<i>Ribosomal Protein L24</i>)	Constituinte estrutural do ribossomo e ligação ao RNA.
CEP97 (<i>Centrosomal Protein 97kDa</i>)	Age como um regulador negativo chave da ciliogênese.
NFKBIZ (<i>Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells</i>)	Envolvido na regulação de complexos de transcrição fator NF-kappa-B.
ZPLD1 (<i>Zona Pellucida-Like Domain Containing 1</i>)	Alta expressão na placenta, seguido pelo pâncreas e músculo esquelético.
ALCAM (<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>)	Molécula de adesão celular que se liga a CD6.
CBLB (<i>Cbl Proto-Oncogene B, E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>)	Dependência de cannabis/Atividade de transdução de sinal e ligação ao íon cálcio.
CD47 (<i>CD47 Antigen</i>)	Meningite neonatal/Tem um papel na adesão celular.
IFT57 (<i>Intraflagellar Transport 57 Homolog (Chlamydomonas)</i>)	Necessária para a formação dos cílios. Tem a função pró-apoptótica.
HHLA2 (<i>Human Endogenous Retrovirus-H Long Terminal Repeat-Associating Protein 2</i>)	Regula a imunidade mediada por células.
MYH15 (<i>Myosin, Heavy Chain 15</i>)	Contração muscular

Continuação da Tabela 5.2

KIAA1524 (<i>Cancerous Inhibitor Of Protein Phosphatase 2A</i>)	Promove o crescimento celular independente de ancoragem e a formação de tumor.
DZIP3 (<i>DAZ Interacting Zinc Finger Protein 3</i>)	Mediar ubiquitinação e subsequente degradação proteossômica de proteínas-alvo.
RETNLB (<i>Resistin Like Beta</i>)	Resistência à insulina e ileíte/Atividade hormonal.
TRAT1 (<i>T Cell Receptor Associated Transmembrane Adaptor 1</i>)	Estabiliza o complexo de TCR (receptor do antígeno das células T) e CD3 na superfície de células-T.
GUCA1C (<i>Guanylate Cyclase Activator 1C</i>)	Estimula guanililciclase 1 (GC1) e GC2 quando a concentração de íons livres de cálcio é baixa e inibe guanilil ciclases quando a concentração de íons de cálcio livre é elevado.
MORC1 (<i>MORC Family CW-Type Zinc Finger 1</i>)	Necessário para a espermatogênese (por semelhança)
DPPA2 (<i>Developmental Pluripotency Associated 2</i>)	Liga-se a promotores de genes alvo e podem estar envolvidas na manutenção do estado epigenético ativo de genes (por semelhança)
DPPA4 (<i>Developmental Pluripotency Associated 4</i>)	Podem estar envolvidos na manutenção do status epigenético ativo de genes-alvo (por semelhança).
PVRL3 (<i>Poliovirus Receptor-Related 3</i>)	Envolvido na formação de junções célula-célula, incluindo junções aderentes e sinapses.
CD96 (<i>CD96 Antigen</i>)	Síndrome do olho do gato/Pode estar envolvida em interações de adesão de células T e NK ativadas durante a fase tardia da resposta imune.
ZBED2 (<i>Zinc Finger, BED-Type Containing 2</i>)	Codificam proteínas reguladoras com diversas funções fundamentais nos vertebrados
PHLDB2 (<i>Pleckstrin Homology-Like Domain, Family B, Member 2</i>)	Parece estar envolvido na montagem do aparelho pós-sináptico.
TAGLN3 (<i>Transgelin 3</i>)	-
C3orf52 (<i>Chromosome 3 Open Reading Frame 52</i>)	-
GCET2 (<i>Germinal Center-Associated, Signaling And Motility</i>)	Envolvido na regulação negativa da motilidade dos linfócitos.
SLC9A10 (<i>Solute Carrier Family 9, Member 10</i>)	Necessário para a mobilidade e fertilidade de espermatozoides.
CD200 (<i>Membrane Glycoprotein MRC OX-2</i>)	Leucemia linfocítica crônica/Co-estimula a proliferação de células T.
BTLA (<i>B And T Lymphocyte Associated</i>)	Artrite reumatóide e panencefalite esclerosante subaguda/Receptor inibitório linfocítico.
ATG3 (<i>Autophagy Related 3</i>)	E2 enzima necessária para conjugar o citoplasma para o transporte vacúolo (CVT), autofagia, e homeostase mitocondrial.
CCDC80 (<i>Coiled-Coil Domain Containing 80</i>)	Promove a adesão celular e montagem de matriz (por semelhança).
CD200R1 (<i>CD200 Receptor 1</i>)	Receptor para o CD200 / OX2 glicoproteína de superfície celular.
BOC (<i>Brother Of CDON</i>)	Promove a diferenciação de células miogênicas.
SPICE1 (<i>Spindle And Centriole Associated Protein 1</i>)	regulador necessário para a duplicação do centríolo para a formação do fuso bipolar apropriada e segregação cromossômica na mitose.
SIDT1 (<i>SID1 Transmembrane Family, Member 1</i>)	Atividade transportadora transmembrana de RNA.
NAA50 (<i>N-Acetyltransferase 13</i>)	Componente catalítico provável do complexo NAA11-NAA15 que exibe atividade de alfa-acetiltransferase (N-terminal)
ATP6V1A (<i>ATPase, H+ Transporting, Lysosomal 70kDa, V1 Subunit A</i>)	Histoplasmose/Subunidade catalítica do complexo V1 periférico de ATPase vacuolar.
DRD3 (<i>Dopamine Receptor D3</i>)	Promove a proliferação celular.
ZNF80 (<i>Zinc Finger Protein 80</i>)	Podem estar envolvidos na regulação da transcrição.

Tabela 5.3: Achados clínicos descritos associados a deleção no segmento cromossômico 3q11.2-q13.31*

n° de clínicas positivas	Referência	#1	DECIPHER												
			971	2575	4673	248474	250169	250274	251017	252215	252517	252522	252523	253907	254040
	Gênero	F	M	M	M	S/R	M	M	M	F	F	F	F	F	M
	Ponto de quebra proximal	q11.2	3q12.1	3q13.11	3q13.2	3q13.11	3q13.13	3q13.13	3q13.11	3q13.2	3q13.2	3q13.13	3q13.11	3q12.1	3q12.1
	Ponto de quebra distal	q13.31	3q13.2	3q13.31	3q13.31	3q13.11	3q13.31	3q13.31	3q21.3	3q13.33	3q13.2	3q13.33	3q13.33	3q12.1	3q12.1
	Tamanho da deleção (Mb)	16.44	13.32	13.15	2.79	0.87	5.28	4.65	22.40	8.80	0.07	12.52	15.07	0.24	0.16
	Região genômica (GRCh38/hg38)	97791743-114234782	99998011-113320741	103698273-116843830	112198329-114983532	103046715-103915789	110239744-115523787	109324690-113973219	104299833-126695285	112702984-121500400	112289468-121150880	108633408-119500926	104429016-99897439	99660325-99728812	9985222
1	Colestase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Lábio inferior Cleft / fenda palatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Palato alto	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Autismo	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	Hiperatividade	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipoplasia do corpo caloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	Deficiência intelectual	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	Onfalocele	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1	Persistência do canal arterial	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Anormalidade do coração	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Desenvolvimento da linguagem atrasado	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
7	Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Aumento do peso corporal	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3	Frouxidão articular	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Atraso motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Obesidade	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Baixa estatura	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Comportamento estereotipado	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Alta estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Queixo pequeno	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Criptorquidia	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Anormalidade do intestino delgado	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Exstrofia cloacal	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Sindactilia/Clinodactilia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3	Hipotonia generalizada	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
1	Raiz nasal larga	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Ponta nasal bulbosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2	Anormalidade de visão	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Fendas palpebrais oblíquas para cima	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Epicanto	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
4	Macrocefalia	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2	Microcefalia	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	Plagiocefalia	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	Anormalidade de pigmentação da pele	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2	hipotireoidismo	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* banco de dado DECIPHER e ClinGen; M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.3

Referência	DECIPHER													
	254141	254385	254497	256510	257508	257891	258397	258478	258505	258860	258888	260320	263693	271208
Gênero	M	F	M	M	M	F	F	M	M	M	F	F	M	M
Ponto de quebra proximal	3q13.2	3q13.2	3q13.13	3q13.2	3q12.3	3q12.1	3q13.2	3q13.2	3q12.1	3q13.13	3q13.13	3q11.2	3q13.13	3q13.2
Ponto de quebra distal	3q13.33	3q13.32	3q13.13	3q13.31	3q21.2	3q12.1	3q13.31	3q13.31	3q12.1	3q13.31	3q13.13	3q12.3	3q13.31	3q13.31
Tamanho da deleção (Mb)	8.08	4.77	0.32	3.31	24.13	0.11	3.36	3.36	0.10	4.57	0.01	4.20	6.68	1.77
Região genômica (GRCh37/hg19)	111999717-120075379	113330895-118097222	108556213-108872073	112183973-115492920	101261977-125395197	99652187-99765927	112143629-115507808	112152400-115507949	99728812-99832816	109955433-114522662	109045079-109056864	97291397-101486528	109781113-116460149	113007525-114781888
Colestase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lábio inferior Cleft / fenda palatina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palato alto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hiperatividade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipoplasia do corpo caloso	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência intelectual	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Onfalocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Persistência do canal arterial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade do coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aumento do peso corporal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frouxidão articular	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Atraso motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Baixa estatura	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento estereotipado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alta estatura	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Queixo pequeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Criptorquidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade do intestino delgado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exstrofia cloacal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sindactilia/Clinodactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonia generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonia muscular	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raiz nasal larga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ponta nasal bulbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade de visão	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Fendas palpebrais oblíquas para cima	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrocefalia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plagiocefalia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade de pigmentação da pele	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hipotireoidismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.3

Referência	DECIPHER									ClinGen				
	273093	276543	288242	289665	291379	292173	293947	294980	303123	nssv577911	nssv577916	nssv580504	nssv1601266	nssv3395211
Gênero	F	M	F	S/R	F	M	M	M	M	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R
Ponto de quebra proximal	3q13.12	3q13.13	3q13.2	3q13.2	3q13.13	3q13.2	3q13.2	3q13.2	3q11.2	3q11.1	3q13.2	S/R	3q13.2	3q13.2
Ponto de quebra distal	3q13.31	3q13.31	3q21.1	3q13.31	3q13.33	3q13.31	3q13.31	3q13.31	3q13.31	3q21.1	3q13.31	S/R	3q13.31	3q13.31
Tamanho da deleção (Mb)	8.54	5.53	11.44	3.33	9.60	3.31	3.31	0.78	20.35	29.33	3.29	0.19	3.30	3.37
Região genômica (GRCh37/hg19)	107393633-115932982	110093416-115627905	112038282-123477568	112164980-115492958	109748316-119344163	112183743-115493090	112183973-115492920	112963935-113745013	94473675-114825050	93605515-122935530	112198329-115492949	102481788-102677637	112183941-115492958	112144081-115514432
Colestase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lábio inferior Cleft / fenda palatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palato alto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiperatividade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipoplasia do corpo caloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência intelectual	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Onfalocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Persistência do canal arterial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade do coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Aumento do peso corporal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frouxidão articular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso motor	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento estereotipado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Alta estatura	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma facial anormal	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Queixo pequeno	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Criptorquidia	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade do intestino delgado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exstrofia cloacal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sindactilia/Clinodactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hipotonia generalizada	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Raiz nasal larga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ponta nasal bulbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade de visão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fendas palpebrais oblíquas para cima	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Epicanto	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Macrocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plagiocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Anormalidade de pigmentação da pele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hipotireoidismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

5.3. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DA AMOSTRA #2 – del6p24.3-p22.3

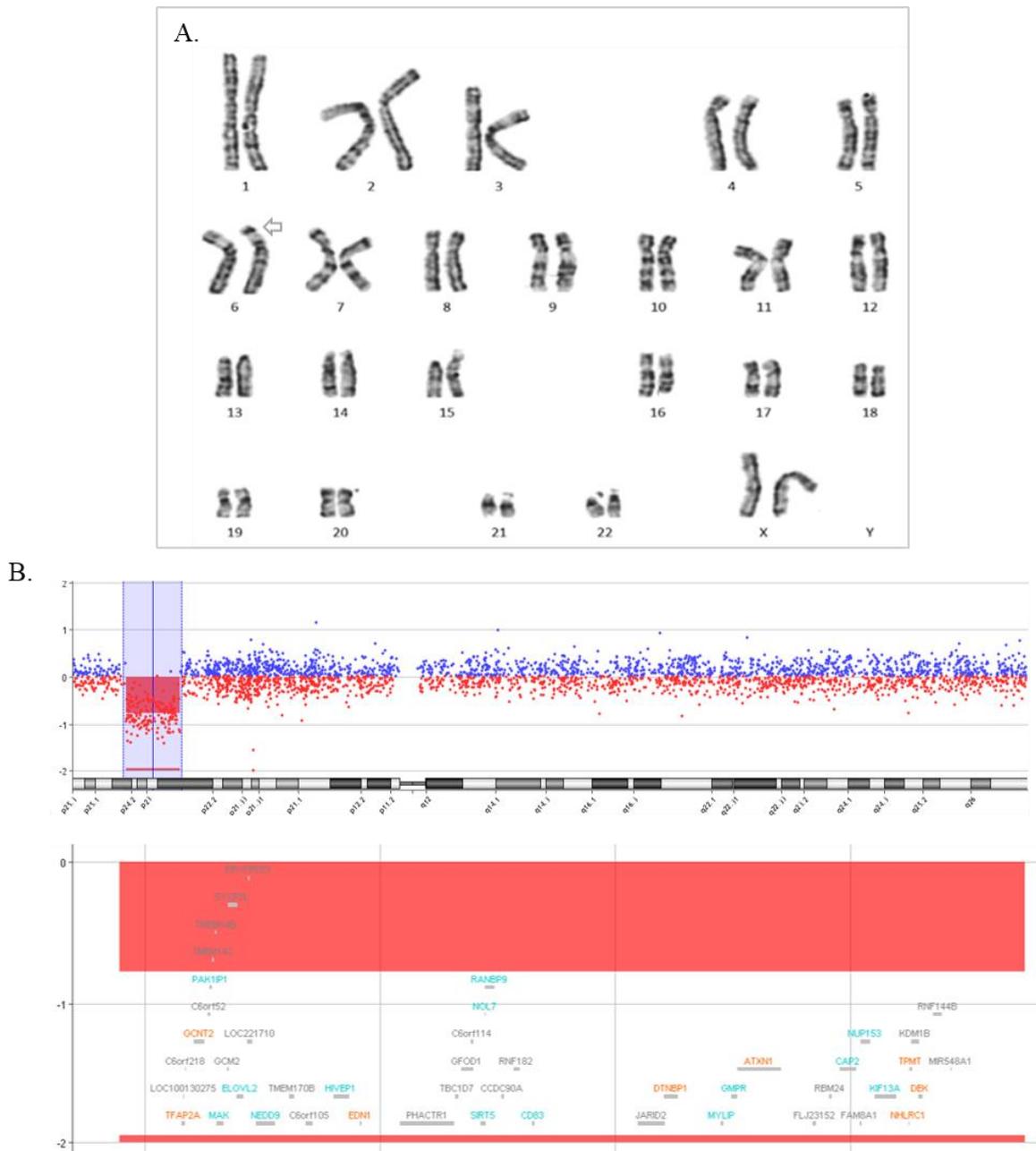


Figura 5.3: Cariótipo por bandamento GTG e representação do perfil cromossômico da amostra #2 com imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra o segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho/ \sim -1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo em bandamento GTG evidencia uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 6 na região p24; (B) *array-CGH* mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 6p24.3-p22.3, de \sim 9.62Mb de tamanho (chr6: 9,734,048-19,355,673).



Figura 5.4: (A) e (B): Paciente com $\text{del}(6)(\text{p}24.3\text{-p}22.3)$ que apresenta hipoplasia cerebral, microftalmia e nistagmo do olho esquerdo, estrabismo, fissura de palato submucosa e lábio leporino a direita, micrognatia severa, comunicação interatrial e interventricular, pé torto à esquerda e retardo do crescimento.

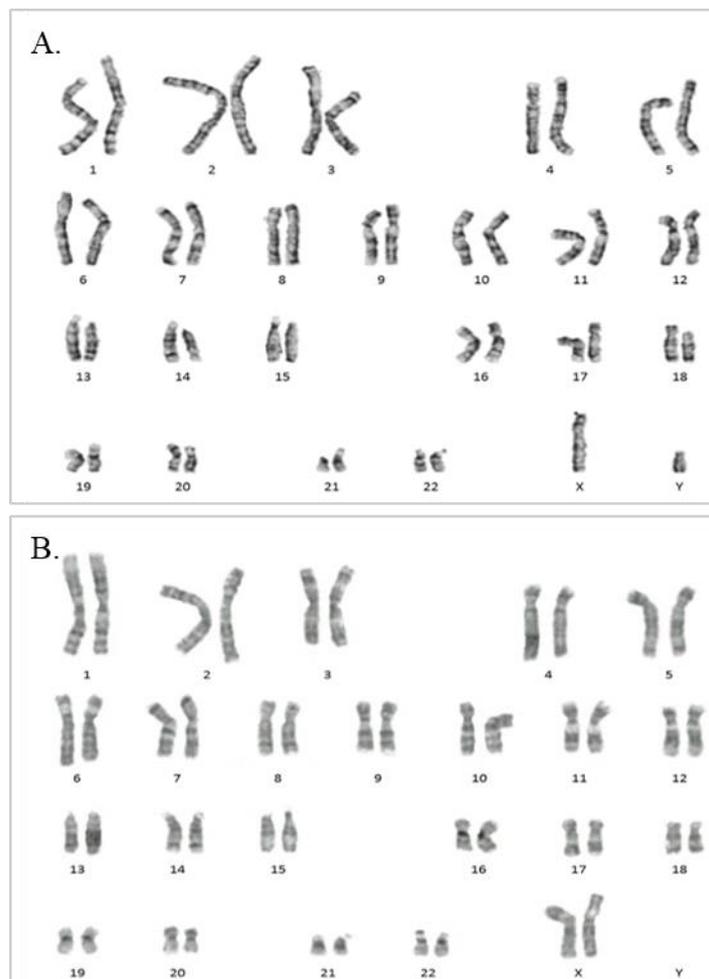


Figura 5.5: Cariótipo por bandamento GTG dos pais do portador da deleção $6\text{p}24.3\text{-p}22.3$. (A) cariótipo paterno normal $46,\text{XY}$; (B) cariótipo materno normal $46,\text{XX}$.

Tabela 5.4. Caracterização gênômica da região 6p24.3-p22.3.

# Amostra: localização cromossômica: posição gênômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
#2: del6p24.3p22.3: 9,734,048-19,355,673	
TFAP2A (<i>Transcription Factor AP-2 Alpha (Activating Enhancer Binding Protein 2 Alpha)</i>)	Timo ectópico e síndrome branchiooculofacial/Ativa genes envolvidos em um amplo espectro de funções biológicas importantes, incluindo desenvolvimento adequado dos olhos, rosto, parede do corpo, membros e tubo neural.
GCNT2 (<i>Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 2, I-Branching Enzyme (I Blood Group)</i>)	Adulto I fenótipo com e sem catarata/Apresenta o grupo sanguíneo I antígeno durante o desenvolvimento embrionário.
PAK1IP1 (<i>PAK1 Interacting Protein 1</i>)	Membro da família quinase PAK, que foram mostrados a desempenhar um papel positivo na regulação de vias de sinalização que envolvem MAPK8 e RELA.
TMEM14C (<i>Transmembrane Protein 14C</i>)	Necessário para a biossíntese do heme normal (por semelhança).
MAK (<i>Male Germ Cell-Associated Kinase</i>)	Retinite pigmentosa/Essencial para a regulação do comprimento ciliar e necessário para a sobrevivência a longo prazo de fotorreceptores (por semelhança). Poderia desempenhar uma função importante na espermatogênese e na estabilidade cromossômica em células de câncer de próstata.
GCM2 (<i>Glial Cells Missing Homolog 2</i>)	Hipoparatiroidismo familiar isolado/Provável regulador transcricional.
ELOVL2 (<i>Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 2</i>)	Ectasia vascular antral gástrica/Catalisa a síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa.
ERVFRDE1 (<i>Endogenous Retrovirus Group FRD, Member 1</i>)	SU medeia o reconhecimento do receptor (por similaridade).
NEDD9 (<i>Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9</i>)	Proteína de encaixe que desempenha um papel de coordenação central para a sinalização relacionada a adesão celular.
C6orf105 (<i>Androgen-Dependent TFPI-Regulating Protein</i>)	Regula a expressão e a atividade anticoagulante associado a células do TFPI inibidor em células endoteliais (in vitro).
HIVEP1 (<i>Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding Protein 1</i>)	Elementos intensificadores de vários promotores virais tais como os de SV40, CMV, ou HIV-1.
EDN1 (<i>Endothelin 1</i>)	Síndrome Auriculocondylar e orelhas em ponto de interrogação/Peptídeos vasoconstritores derivado do endotélio.
PHACTR1 (<i>Phosphatase And Actin Regulator 1</i>)	Liga-se monômeros de actina (actina G) e desempenha um papel na reorganização do citoesqueleto de actina e na formação de fibras de actina.
TBC1D7 (<i>TBC1 Domain Family, Member 7</i>)	Megalencefalia isolada e síndrome macrocefalia-megalencefalia/Componentes do complexo de TSC-TBC, que consiste na ativação de GTPase funcional (GAP).
SIRT5 (<i>Sirtuin 5</i>)	Contribui para a regulação dos níveis de amônia no sangue durante o jejum prolongado.
NOL7 (<i>Nucleolar Protein 7</i>)	Atividade antiangiogênica.
RANBP9 (<i>RAN Binding Protein 9</i>)	Ligação da enzima Ran e GTPase.
CD83 (<i>CD83 Antigen</i>)	Pode desempenhar um papel significativo na apresentação de antígenos ou nas interações celulares que acompanham a ativação dos linfócitos.
JARID2 (<i>Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2</i>)	Desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário, incluindo: coração, fígado, fusão do tubo neural e hematopoiese.
DTNBP1 (<i>Dystrobrevin Binding Protein 1</i>)	Síndrome de Hermansky-Pudlak/Desempenha um papel no tráfico de vesículas sinápticas e na liberação do neurotransmissor.
MYLIP (<i>Myosin Regulatory Light Chain Interacting Protein</i>)	Atua como um inibidor dependente de esteroide na absorção de colesterol celular mediando a ubiquitinação e subsequente degradação de LDLR.
GMPR (<i>Guanosine Monophosphate Reductase</i>)	Funções na conversão de nucleobases mantendo o equilíbrio intracelular de nucleótidos A e G.

Continuação da Tabela 5.4

ATXN1 (<i>Ataxin 1</i>)	Ataxia e spinocerebellar ataxia/Pode estar envolvida no metabolismo de RNA.
NUP153 (<i>Nucleoporin 153kDa</i>)	Componentes do complexo do poro nuclear (NPC), envolvida no controle de qualidade e a retenção de mRNAs não excisado do núcleo.
KIF13A (<i>Kinesin Family Member 13A</i>)	Proteína motora envolvida no transporte intracelular e regulação de vários processos durante biogênese do melanossoma e da citocinese.
NHLRC1 (<i>NHL Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1</i>)	Síndrome neuroléptica maligna, e doença de Lafora relacionadas com nhlrc1/Suprime a toxicidade celular de proteínas deformadas, promovendo a sua degradação.
TPMT (<i>Thiopurine S-Methyltransferase</i>)	Deficiência de tiopurina s-metiltransferase e pancitopenia/Catalisa a metilação de drogas de tiopurina, tais como 6-mercaptopurina.
KDM1B (<i>Lysine (K)-Specific Demethylase 1B</i>)	Demethylase de histona.
DEK(<i>DEK Oncogene</i>)	Leucemia aguda não linfocítica e iridocyclitis/Envolvidos na organização da cromatina.

Tabela 5.5: Achados clínicos descritos associados a deleção no segmento cromossômico 6p22.3-p24.3

	Referência	DECIPHER													ClinGen	
		#2	249613	255115	256835	263354	265752	273489	278152	285749	288102	288812	289237	289809	nssv707145	nssv576260
	Gênero	F	S/R	M	F	M	M	F	M	M	F	S/R	F	S/R	S/R	S/R
	Ponto de quebra proximal	p22.3	6p22.3	6p22.3	6p22.3	6p22.3	6p22.3	6p22.3	6p22.2	6p24.2	6p22.3	6p23	6p24.2	6p23	6p24.1	6p22.3
	Ponto de quebra distal	p24.3	6p22.3	6p22.3	6p24.1	6p24.1	6p24.3	6p24.1	6p22.3	6p24.3	6p22.3	6p23	6p24.3	6p23	6p25.2	6p25.2
	Tamanho da deleção (Mb)	9.62	4.75	0.01	4.85	10.63	8.89	7.36	6.54	1.06	2.55	0.18	1.12	0.18	9.19	13.83
n° de clínicas positivas	Região genômica (GRCh38/hg38)	9734048-19355673	18829825-23576125	15468042-15473464	13071924-17918584	12581384-23208409	10301272-19190219	12184608-19548572	18684863-25226529	10181231-11244604	19153386-21698497	13797138-13978242	9615544-10738283	13797138-13978242	4069026-13268031	2862874-16698019
1	Epiglote bífida	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Fenda palatina	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	Lábio leporino	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1	Glossoptose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Atrofia/degeneração do corpo caloso	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Autismo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1	Convulsões febris	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	Hipotonia generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	Hipotonia axial Infantil	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Deficiência intelectual	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
2	Hipotonia muscular	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Defeito do Septo ventricular	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Retardo de crescimento	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Atraso no global do desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1	Hiperatividade	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Micrognatia	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1	Filtro curto	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Microftalmia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Nistagmus	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Epicanto	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Estrabismo	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Trigonocefalia	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Pés equinovarus	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* banco de dado DECIPHER e ClinGen; M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

5.4. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DA AMOSTRA #3 – del18q21.2-q23

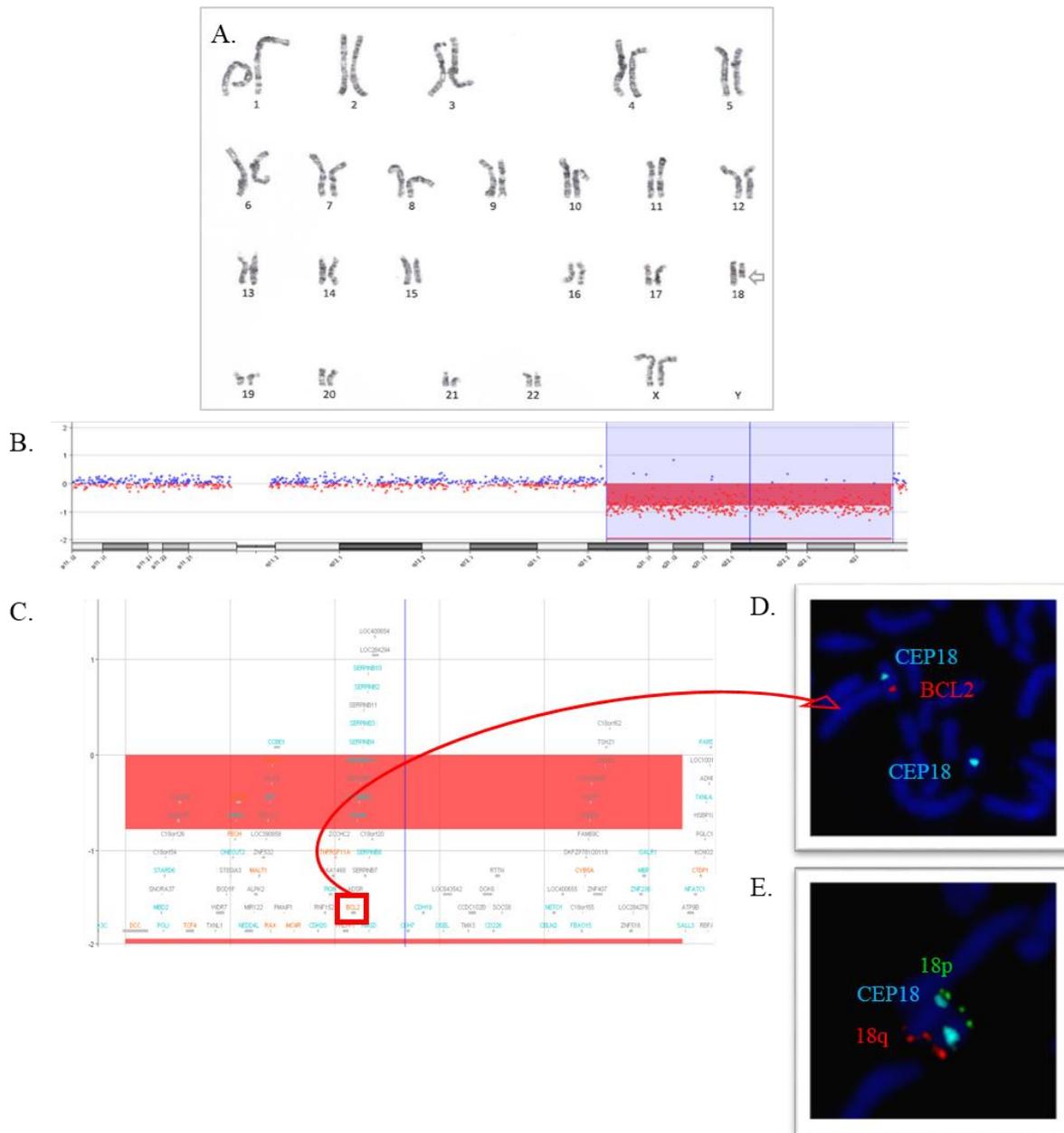


Figura 5.6: Representação do perfil cromossômico da amostra #3 e Imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossomômico mostra o segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo em bandamento GTG evidencia uma deleção no braço longo do cromossomo 18 na região q21; (B) *array-CGH* mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 18q21.2-q23, de ~ 26.61Mb de tamanho (chr18: 18:52,475,229-78,858,446); (C) Perfil gênico da região 18q21.2-q23 incluindo BCL2 que foi utilizado como controle em FISH; (D) FISH com sondas CEP18/D18Z1 (sinal aqua) e BCL2/18q21.33 (sinal vermelho) mostra ausência de sinal vermelho em um dos cromossomos 18; (E) FISH com sondas CEP18 (sinal aqua), subteloemere 18p/18p11.32 (sinal verde) e subteloemere 18q/18q23 (sinal em vermelho) com padrão de hibridização que indica a ocorrência de uma inversão da região braço longo do cromossomo 18 (à direita).



Figura 5.7: (A) e (B): Paciente com inv del(18)(q21.2-q23) que apresenta microcefalia, hipoplasia cerebral, estreitamento bitemporal, epicanto, polegares longos, fosseta sacral, hipotonia, apresenta retardo do crescimento, atraso neuropsicomotor e de linguagem e movimentos estereotipados.

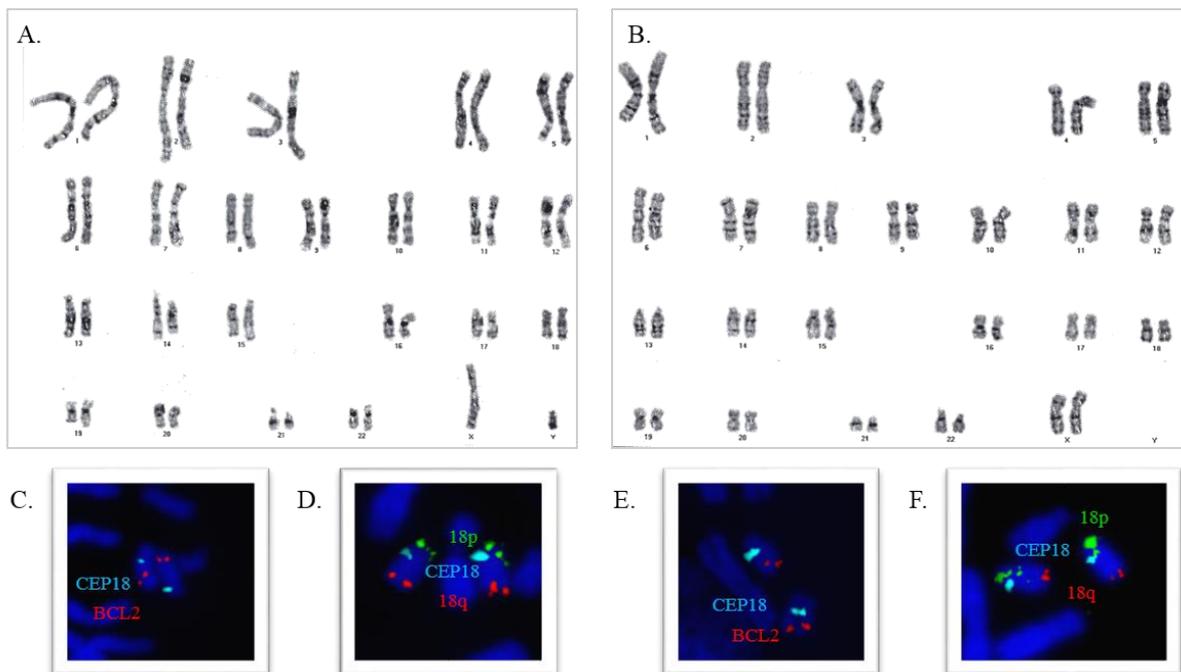


Figura 5.8: Cariótipo por bandamento GTG e FISH dos pais do portador da deleção 18q21.2-q23. (A) cariótipo paterno normal 46,XY; (B) cariótipo materno 46,XX; (C) FISH paterno com sondas CEP18/D18Z1 (sinal aqua) e BCL2/18q21.33 (sinal vermelho) mostra padrão normal de hibridização; (D) FISH paterno com sondas CEP18 (sinal aqua), subteloemere 18p/18p11.32 (sinal verde) e subteloemere 18q/18q23 (sinal vermelho); (E) FISH materno com sondas CEP18/D18Z1 (sinal aqua) e BCL2/18q21.33 (sinal vermelho) mostra padrão normal de hibridização; (F) FISH materno com sondas CEP18 (sinal aqua), subteloemere 18p/18p11.32 (sinal verde) e subteloemere 18q/18q23 (sinal vermelho) padrão normal de hibridização.

Tabela 5.6. Caracterização genômica da região 18q21.2-q23.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
#3: del18q21.2-q23: 52,475,229-78,858,446	
DCC (<i>Deleted In Colorectal Carcinoma</i>)	Movimentos espelhados e câncer colorretal/Receptor de netrín requerido para orientação do axônio.
MBD2 (<i>Methyl-CpG-Binding Domain Protein 2</i>)	Liga-se a ilhas de CpG em promotores onde o DNA é metilado.
POLI (<i>Polymerase (DNA Directed) Iota</i>)	Traqueíte/DNA polimerase propenso a erros especificamente envolvida no reparo do DNA.
STARD6 (<i>StAR-Related Lipid Transfer (START) Domain Containing 6</i>)	Pode estar envolvidos no transporte intracelular de esteróis ou outros lípidos.
C18orf54 (<i>Chromosome 18 Open Reading Frame 54</i>)	Adenoma e infarto do miocárdio inferior/Pode desempenhar um papel na proliferação celular (por semelhança).
RAB27B (<i>Ras-associated protein RAB27B</i>)	Síndrome Griscelli e síndrome de Birt-Hogg-Dube
TCF4 (<i>Transcription Factor 4</i>)	Síndrome de Pitt-Hopkins e diabetes mellitus tipo 2/Envolvido no início de diferenciação neuronal.
TXNL1 (<i>Thioredoxin-Like 1</i>)	Adenocarcinoma de timo/Atividade de oxidoredutase de dissulfeto de transporte de elétrons.
WDR7 (<i>Wd Repeat-Containing Protein 7</i>)	Membro da família de proteínas repetição WD.
LINC-ROR (<i>Long Intergenic Non-Protein Coding RNA, Regulator Of Reprogramming</i>)	Filiado com a classe lncRNA.
ST8SIA3 (<i>ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 3</i>)	Pode transferir ácido siálico através de oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípidos.
ONECUT2 (<i>One Cut Homeobox 2</i>)	Hemofilia B/ativador transcricional.
FECH (<i>Ferrochelatase</i>)	Protoporfiria eritropoiética/Catalisa a inserção ferrosa em protoporfirina IX.
NARS (<i>Asparaginyl-TRNA Synthetase</i>)	Asparagina-tRNA, atividade de ligase e de ligação de ácido nucleico.
ATP8B1 (<i>ATPase, Aminophospholipid Transporter, Class I, Type 8B, Member 1</i>)	Baixa gama-GT, colestase intra-hepática benigna e recorrente/Pode desempenhar um papel no transporte distribuição de fosfolípidos e de ácidos biliares.
NEDD4L (<i>Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4-Like</i>)	Hipertensão/Promove ubiquitinação e internalização de vários canais de membrana plasmática.
MIR122 (<i>MicroRNA 122</i>)	Doença de Borna e câncer de fígado/Inibição translacional ou desestabilização do mRNA alvo.
MALT1 (<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Gene 1</i>)	Imunodeficiência e linfoma de pulmão/Tem atividade de ubiquitina ligase e peptidase.
GRP (<i>Gastrin-Releasing Peptide</i>)	Fibrose pulmonar difusa e do câncer de pâncreas/GRP estimula a liberação de gastrina, bem como outras hormônios gastrointestinais.
RAX (<i>Retina And Anterior Neural Fold Homeobox</i>)	Anoftalmia e microftalmia/desempenha um papel crítico na formação do olho através da regulação da especificação inicial de células da retina e/ou a sua proliferação subsequente.
CPLX4 (<i>Complexin 4</i>)	Rregulação positiva de um passo final da exocitose sináptica de vesículas (por semelhança).
LMAN1 (<i>Lectin, Mannose-Binding, 1</i>)	Deficiência combinada de fator V e VIII/Pode estar envolvido na manipulação ou reciclagem de proteínas, lípidos, ou ambos.
CCBE1 (<i>Collagen And Calcium Binding EGF Domains 1</i>)	Síndrome de Hennekam/Obrigatório para o brotamento angiogênico do endotélio venoso durante a embriogênese.
PMAIP1 (<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i>)	Leucemia de células T/Promove a ativação de caspases e apoptose.
MC4R (<i>Melanocortin 4 Receptor</i>)	Obesidade/Receptor específico para o núcleo heptapeptídico comum ao hormônio adrenocorticotrópico alfa-, beta-, e gama-MSH.

Continuação da tabela 5.6

CDH20 (<i>Cadherin 20, Type 2</i>)	Adesão celular de proteínas cálcio-dependentes.
RNF152 (<i>Ring Finger Protein 152</i>)	Atividade de transferase e ubiquitinação de proteína. Induz apoptose quando superexpressada.
PIGN (<i>Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis, Class N</i>)	Síndrome de anomalias múltiplas, hipotonia e convulsões/Envolvida na biossíntese de glicosil-fosfatidilinositol-âncora.
TNFRSF11A (<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11a, NFKB Activator</i>)	Periostite e osteopetrosis/Receptor essencial para a osteoclastogênese mediada por RANKL e envolvido na regulação das interações entre as células T e células dendríticas.
PHLPP1 (<i>PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 1</i>)	Obesidade/Inibe a proliferação de células cancerosas e pode atuar como um supressor do tumor.
BCL2 (<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>)	Displasia mamária benigna e carcinoma cístico da glândula salivar adenóide/suprime a apoptose numa variedade de sistemas celulares e regula a morte celular através do controle da permeabilidade da membrana mitocondrial.
FVT1 (<i>3-Ketodihydrospingosine Reductase</i>)	Linfoma folicular/Catalisa a redução da 3-ketodihydrospingosine (KDS) para dihydrospingosine (DHS).
VPS4B (<i>Vacuolar Protein Sorting 4 Homolog B</i>)	Envolvido em etapas tardias da via de corpos multivesiculares endossomais (MVB).
SERPINB5 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 5</i>)	adenocarcinoma polimórfico de baixo grau e carcinoma de laringe/Supressor tumoral.
SERPINB12 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 12</i>)	Inibe a tripsina e a plasmina, mas não a trombina, fator de coagulação Xa, ou ativador do plasminogénio do tipo uroquinase.
SERPINB13 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 13</i>)	Pode ter um papel na proliferação ou diferenciação de queratinócitos.
SERPINB4 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 4</i>)	Papiloma invertido e queimaduras/Pode atuar como um inibidor de protease para modular a resposta imune do hospedeiro contra as células tumorais.
SERPINB3 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member</i>)	Carcinoma de células escamosas do colo do útero e câncer oral/Pode atuar como inibidor da protease de modular a resposta imune do hospedeiro contra as células tumorais e também funciona como um inibidor de apoptose induzido por UV.
SERPINB11 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 11</i>)	Não tem atividade inibidora de serina-protease, provavelmente devido a mutações no esqueleto prejudicando mudança conformacional.
SERPINB7 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member</i>)	Queratoderma palmo-plantar e Iga glomerulonefrite/Pode funcionar como um inibidor de proteases específicas Lys-e influenciar a maturação de megacariócitos.
SERPINB2 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 2</i>)	Distúrbios da articulação e gengivite/Inibe ativador do plasminogénio tipo uroquinase.
SERPINB10 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 10</i>)	Inibidor de protease que pode desempenhar um papel de regulação durante a hematopoiese e a apoptose induzida por TNF.
HMSD (<i>Histocompatibility (Minor) Serpin Domain Containing</i>)	Transplante de células-tronco hematopoiéticas/Inibidor de serina-protease putativo (por semelhança).
SERPINB8 (<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 8</i>)	Atividade inibidora da endopeptidase tipo serina.
CDH7 (<i>Cadherin 7, Type 2</i>)	Síndrome de Gharghe/Proteínas de adesão celular dependentes do cálcio.
CDH19 (<i>Cadherin 19, Type 2</i>)	Síndrome de van Maldergem/Proteínas de adesão celular dependentes do cálcio.
DSEL (<i>Dermatan Sulfate Epimerase-Like</i>)	Atividade de isomerase e sulfotransferase.
TMX3 (<i>Thioredoxin-Related Transmembrane Protein 3</i>)	Provável Isomerase de dissulfeto, que participa na dobragem de proteínas que contêm ligações dissulfeto.
DOK6 (<i>Docking Protein 6</i>)	Promove o crescimento de neurites mediada por Ret. Pode ter um papel no desenvolvimento e/ou manutenção do cérebro
CD226 (<i>CD226 Antigen</i>)	Poliendocrinopatia autoimune tipo 2 e doença celíaca refratária/Receptor envolvido na adesão intercelular, sinalização de linfócitos, citotoxicidade e secreção de linfocinas.

Continuação da tabela 5.6

RTTN (<i>Rotatin</i>)	Polimicrogria com convulsões e miopatia hereditária com insuficiência respiratória precoce/Envolvidas na cascata genética que rege especificação esquerda-direita.
SOCS6 (<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 6</i>)	Proteínas da família SOCS fazem parte de um sistema de feedback negativo clássico que regula o sinal de transdução de citocinas.
CBLN2 (<i>Cerebellin 2 Precursor</i>)	Hipertensão pulmonar primária e hipertensão arterial pulmonar hereditária/Pode desempenhar papel na indução sinaptogênese (por semelhança).
NETO1 (<i>Neuropilin (NRP) And Tolloid (TLL)-Like 1</i>)	Envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção de circuitos neuronais.
FBXO15 (<i>F-Box Protein 15</i>)	Componente do substrato-reconhecimento do SCF (proteína SKP1-CUL1-F-box) -tipo complexo ubiquitina ligase E3 (por semelhança).
TIMM21 (<i>Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 21 Homolog (Yeast)</i>)	Participa na translocação no trânsito de proteínas contendo peptídeos através da membrana interna mitocondrial.
CYB5A (<i>Cytochrome B5 Type A (Microsomal)</i>)	Metemoglobinemia tipo IV/Transportador de electrons para várias oxigenases ligadas à membrana.
FAM69C (<i>Family With Sequence Similarity 69, Member C</i>)	Atividade de transferase de grupos contendo fósforo.
CNDP2 (CNDP Dipeptidase 2 (Metallopeptidase M20 Family))	Síndrome de Edwards/Hidrolisa uma variedade de dipeptídeos, incluindo L-carnosina mas tem uma forte preferência para Cys-Gly.
CNDP1 (<i>Carnosine Dipeptidase 1 (Metallopeptidase M20 Family)1 2</i>)	Homocarnosinosis e nefropatia diabética/Metalopeptidase e actividade dipeptidásica.
ZNF407 (<i>Zinc Finger Protein 407</i>)	Deficiência intelectual não-sindrômica e síndrômica/Pode estar envolvido na regulação da transcrição.
TSHZ1 (<i>Teashirt Zinc Finger Homeobox 1</i>)	Atresia aural congênita e câncer de cólon/Provável regulador transcricional envolvido em processos de desenvolvimento.
ZNF516 (<i>Zinc Finger Protein 516</i>)	Podem estar envolvidos na regulação transcricional e atuar como supressor de estresse relacionado a replicação e má segregação cromossômica.
ZNF236 (<i>Zinc Finger Protein 23</i>)	Pode estar envolvido na regulação transcricional
MBP (<i>Myelin Basic Protein</i>)	Mutismo acinético e malformação de Chiari/Formação e estabilização da membrana de mielina no SNC.
GALR1 (<i>Galanin Receptor 1</i>)	Receptor para o hormônio galanina.

Tabela 5.7: Achados clínicos descritos associados a deleção no segmento cromossômico 18q21.2-q23*

nº de clínicas positivas	Referência	#3	DECIPHER												
			1024	248373	248467	248721	249188	250369	250498	251072	251081	252206	253617	253873	254159
	Gênero	F	F	other	other	F	F	F	M	F	F	M	M	F	M
	Ponto de quebra proximal	q21.2	18q21.2	18q21.32	18q21.2	18q21.2	18q22.1	18q22.1	18q21.2	18q21.31	18q22.1	18q21.2	18q22.3	18q21.31	18q22.2
	Ponto de quebra distal	q23	18q21.2	18q23	18q21.2	18q21.2	18q22.1	18q23	18q21.2	18q23	18q23	18q21.32	18q23	18q23	18q23
	Tamanho da deleção (Mb)	26.61	0.20	19.65	0.06	3.19	1.51	14.37	0.14	21.95	14.93	6.69	5.09	23.80	0.17
	Região genômica (GRCh38/hg38)	52475229-78858446	53294589-53497081	58365845-78015180	52857682-52918717	49769001-52961970	63038586-64550981	63635289-78010032	53290010-53425339	56063722-78010032	63059145-77987670	49644582-56338225	72928199-78016181	54211902-78014582	67686352-67855457
1	Boca aberta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Hipoplasia cerebral	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Movimentos estereotipados	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ataxia	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Deficiência intelectual	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Convulsões	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
1	Achatamento malar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Retardo de crescimento	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Discurso e desenvolvimento da linguagem atrasados	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
2	Atraso no desenvolvimento global	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Baixa estatura	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
2	Pequeno para a idade gestacional	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Estreitamento bitemporal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2	Baixo implantação capilar	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	Micrognatia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Filtro labial curto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1	Criptorquidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Constipação	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
2	Hérnia inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Polegar largo	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Hipotonia muscular	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
1	Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Epicanto	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Miopia	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
7	Estrabismo	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	Deficiência auditiva	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
14	Microcefalia	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
2	Fosseta sacral	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Escoliose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2	Proeminência frontal	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Dedo do pé largo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Pé torto congênito equinovalgus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1	Anomalia do sistema nervoso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Persistência do canal arterial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*banco de dados DECIPHER e ClinGen; M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.7.

Referência	DECIPHER														
	254301	256243	256951	256965	257087	257395	258894	263315	265501	270323	275273	276050	277615	278389	281827
Gênero	M	M	M	F	M	other	M	M	F	F	F	M	M	F	M
Ponto de quebra proximal	18q21.2	18q23	18q21.2	18q21.31	18q21.31	18q22.3	18q21.2	18q21.2	18q21.31	18q21.32	18q22.3	18q21.2	18q22.3	18q23	18q21.33
Ponto de quebra distal	18q21.2	18q23	18q22.3	18q21.2	18q23	18q23	18q21.33								
Tamanho da deleção (Mb)	0.07	3.09	24.22	22.72	21.77	5.63	26.33	26.19	21.47	20.71	0.61	0.33	8.06	0.42	0.03
Região genômica (GRCh37/hg19)	52846504-52912264	73344273-76434884	53764021-77982267	55293118-78015057	56128518-77898549	72380146-78014582	51656918-77982126	51818129-78012960	56513207-77982126	57274734-77982126	69874100-70479590	50072233-50398972	69955623-78014582	74923623-75348190	61480091-61512336
Boca aberta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipoplasia cerebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimentos estereotipados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Deficiência intelectual	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Achatamento malar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retardo de crescimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Discurso e desenvolvimento da linguagem atrasados	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Atraso no desenvolvimento global	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baixa estatura	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Pequeno para a idade gestacional	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Estreitamento bitemporal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorismo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baixo implantação capilar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Filtro labial curto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Criptorquidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constipação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hérnia inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Polegar largo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonia muscular	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miopia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrabismo	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência auditiva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcefalia	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Fosseta sacral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esvolto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proeminência frontal	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dedo do pé largo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pé torto congênito equinoválus	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anomalia do sistema nervoso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Persistência do canal arterial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.7.

Referência	DECIPHER								ClinGen					
	282280	284005	284915	285977	287446	288435	289604	289971	nssv577648	nssv577652	nssv583238	nssv1601332	nssv1601552	nssv3397377
Gênero	M	F	M	F	M	S/R								
Ponto de quebra proximal	18q21.32	18q22.2	18q21.2	18q21.2	18q21.32	18q22.3	18q21.32	18q22.3	18q21.2	18q21.31	18q21.2	S/R	18q22.3	18q22.1
Ponto de quebra distal	18q23	18q23	18q21.2	18q21.2	18q21.32	18q22.3	18q23	18q22.3	18q21.31	18q23	18q23	S/R	18q23	18q23
Tamanho da deleção (Mb)	19.49	10.66	0.09	0.24	0.51	0.07	21.08	0.24	3.07	23.72	26.61	0.54	8.30	13.89
Região genômica (GRCh37/hg19)	58527052-78014123	67357305-78013728	53086367-53178430	52940728-53180419	57126613-57640965	70866440-70941272	56930997-78012819	68974188-69210878	51943823-55015023	54285269-78010032	51391427-78010032	63909629-64457524	69711141-78012819	64123586-78014123
Boca aberta	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hipoplasia cerebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimentos estereotipados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência intelectual	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Achatamento malar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retardo de crescimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Discurso e desenvolvimento da linguagem atrasados	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Atraso no desenvolvimento global	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pequeno para a idade gestacional	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estreitamento bitemporal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baixo implantação capilar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Filtro labial curto	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Criptorquidia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constipação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hérnia inguinal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polegar largo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonia muscular	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miopia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrabismo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência auditiva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcefalia	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Fosseta sacral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escoliose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proeminência frontal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dedo do pé largo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pé torto congênito equinovalgus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anomalia do sistema nervoso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Persistência do canal arterial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

5.5. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DA AMOSTRA #4 – dup8q24.12-q24.3

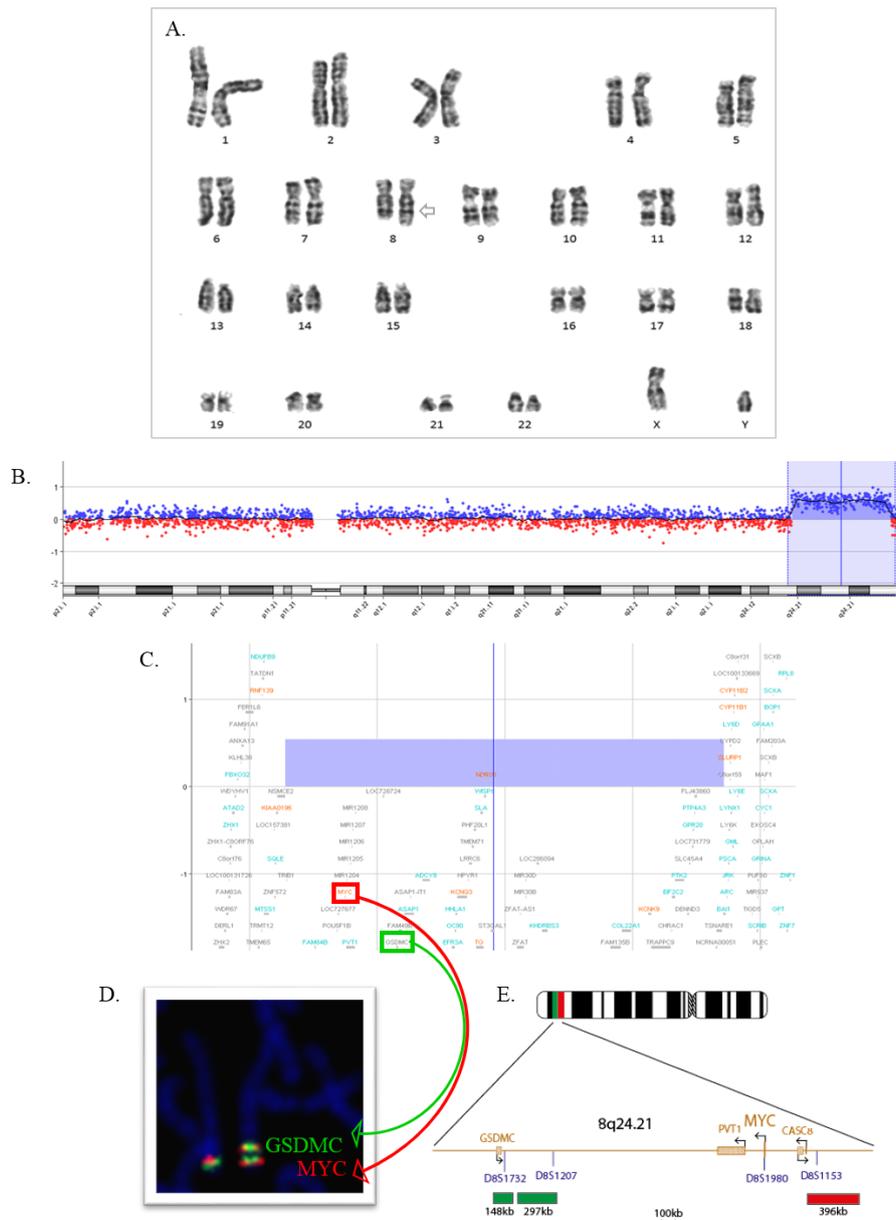


Figura 5.9: Representação do perfil cromossômico da amostra #4 e imagem de *array*-CGH utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra o segmento alterado duplicado. A barra horizontal (em azul/~+1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo em bandamento GTG evidencia material adicional no braço longo do cromossomo 8 na região q24; (B) *array*-CGH mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 8q24.13-q24.3, de ~ 17.1Mb de tamanho (125,385,074-142,496,610); (C) Perfil gênico da região 8q24.13-q24.3 incluindo *MYC* (vermelho) e *GSDMC* (verde) que foram utilizados como controle na FISH; (D) FISH com sondas MYC/8q24.21 (sinal vermelho) e GSDMC/8q24.21 (sinal verde) mostra inversão e duplicação do segmento cromossômico; (E) Diagrama esquemático da localização das sondas (CytoCell®).



Figura 5.10: (A) e (B): Paciente com inv dup(8)(q24.12-q24.3) que apresenta microcefalia, cabelo de implantação baixa na frente, cílios longos, micrognatia, hemangioma no lábio inferior à esquerda, crise convulsiva em vigência de febre e atraso de fala; (C) e (D): Mãe do paciente com inv dup(8)(q24.12-q24.3) que apresenta fenda lábiopalatina e dificuldade de aprendizado.

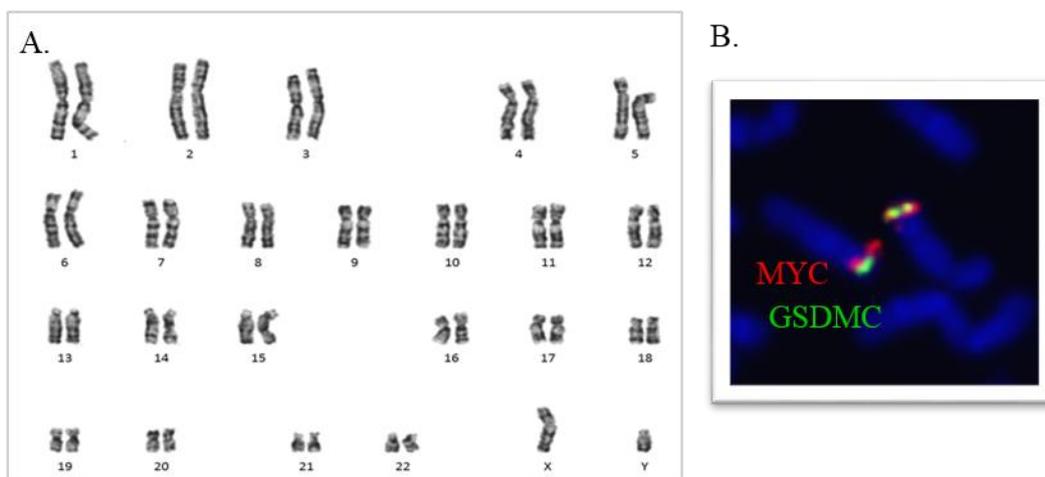


Figura 5.11: Cariótipo por bandamento GTG e FISH do pai do portador da dup8q24.13-q24.3. (A) cariótipo normal 46,XY; (B) FISH com sondas MYC/8q24.21 (sinal vermelho) e GSDMC (sinal verde) mostra padrão normal de hibridização.

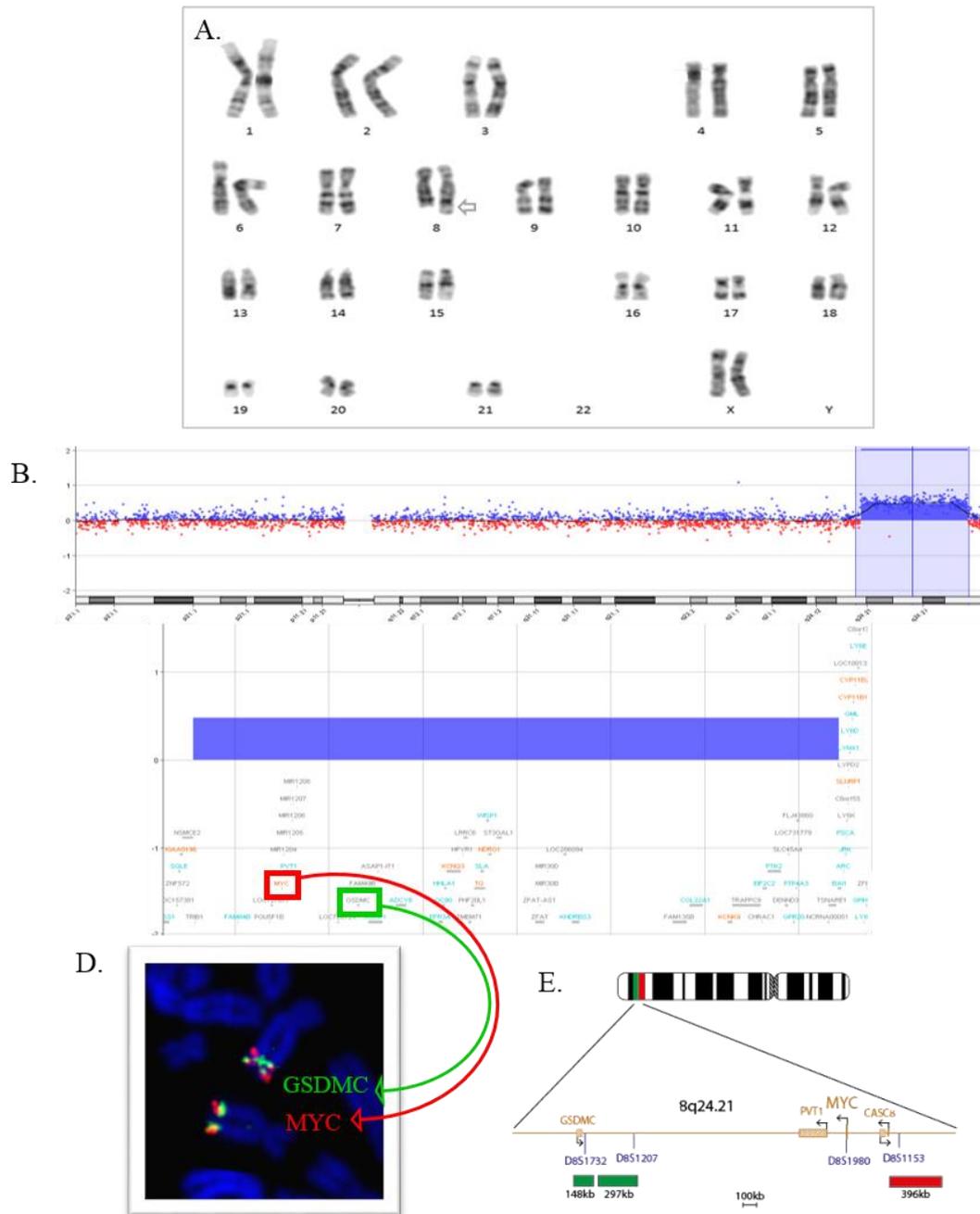


Figura 5.12: Cariótipo por bandamento GTG e representação do perfil cromossômico da mãe do portador da dup8q24.13-q24.3 e com imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra o segmento alterado detectado. A barra horizontal (em azul/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo evidencia material adicional no braço longo do cromossomo 8 na região q24; (B) *array-CGH* mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 8q24.13-q24.3, de ~ 17.1Mb de tamanho (125,385,074-142,496,610); (C) Perfil gênico da região 8q24.13-q24.3 incluindo *MYC* (vermelho) e *GSDMC* (verde) que foram utilizados como controle na FISH; (D) FISH com sondas *MYC*/8q24.21 (sinal vermelho) e *GSDMC* (sinal verde) mostra inversão e duplicação do segmento cromossômico; (E) Diagrama esquemático da localização das sondas (Cytocell®). *GSDMC* (Gasdermin C); *MYC* (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog).

Tabela 5.8. Caracterização gênômica da região 8q24.13-q24.3.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
#4: dup8q24.13-q24.3: 125,385,074-142,496,610	
TRIB1 (<i>Tribbles Pseudokinase 1</i>)	Doença isquêmica cardíaca e Hipercolesterolemia Familiar/Interage e regula a ativação de quinases MAP.
FAM84B (<i>Family With Sequence Similarity 84, Member B</i>)	Câncer de mama e adenocarcinoma gastroesofágico/Interage com alfa-1 catenin (CTNNA1).
PCAT1 (<i>Prostate Cancer Associated Transcript 1 (Non-Protein Coding)</i>)	Câncer de Prostata/RNA afiliado com a classe lncRNA.
PRNCR1 (<i>Prostate Cancer Associated Non-Coding RNA 1</i>)	Câncer de Prostata/RNA afiliado com a classe lncRNA.
POU5F1B (<i>POU Class 5 Homeobox 1B</i>)	Mostra atividade faca de ativador de transcrição.
MYC (<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>)	Câncer do seio maxilar e carcinoma endocervical/Factor de transcrição que se liga ao DNA de forma não específica.
PVT1 (<i>Pvt1 Oncogene</i>)	Linfoma de Burkitt
CCDC26 (<i>Coiled-Coil Domain Containing 26</i>)	RNA afiliado com a classe lncRNA.
GSDMC (<i>Gasdermin C</i>)	Melanoma.
ASAP1 (<i>ADP-Ribosylation Factor-Directed GTPase-Activating Protein 1</i>)	Pode coordenar o tráfico de membrana com o crescimento celular ou com remodelação do citoesqueleto de actina, pode funcionar como uma proteína de transdução de sinal envolvida na diferenciação dos fibroblastos em adipócitos e possivelmente outros tipos de células (por semelhança). Desempenha um papel na cilogênese.
ADCY8 (<i>Adenylate Cyclase 8</i>)	Adenoma e adenoma da tireóide, pode estar associada ao aprendizado/Cálcio-estimulável adenilil-ciclase ligada à membrana.
EFR3A (<i>EFR3 Homolog A (S. Cerevisiae)</i>)	Proteína de membrana.
OC90 (<i>Otoconin 90</i>)	-
HHLA1 (<i>HERV-H LTR-Associating 1</i>)	Nistagmo paroxístico posicional benigno e oligodrâmnio/Esta família tem mostrado desempenhar um papel na expressão de uma variedade de genes adjacentes.
KCNQ3 (<i>Potassium Voltage-Gated Channel, KQT-Like Subfamily, Member 3</i>)	Epilepsia neonatal familiar benigna e convulsões/Provavelmente importante na regulação da excitabilidade neuronal.
LRRC6 (<i>Leucine Rich Repeat Containing 6</i>)	Discinesia ciliar primária / pode desempenhar um papel na motilidade ciliar.
TG (<i>Thyroglobulin</i>)	Disormonogênese tireóide e câncer de ovário maligno / Precursor da hormônio iodados da tireóide: tiroxina (T4) e triiodotironina (T3).
SLA (<i>Src-like-adaptor</i>)	Hipoplasia tipo pontocerebelosa/Proteína adaptadora, que regula negativamente a sinalização do receptor de células T (TCR).
WISP1 (<i>WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1</i>)	Hemimegalencefalia / regulador Downstream na via de sinalização Wnt/Frizzled. Associado com a sobrevivência da célula.
NDRG1 (<i>N-Myc Downstream Regulated 1</i>)	Neuropatia de Charcot-Marie-Tooth e neuropatia motora e sensorial hereditária/Proteína responsiva ao estresse envolvida em respostas hormonais, crescimento e diferenciação celular. Atua como um supressor tumoral em muitos tipos de células. Protege as células dos danos ruptura do fuso.
ST3GAL1 (<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 1</i>)	Pode ser responsável pela síntese de sequências encontradas em cadeias de açúcar ligadas a O-Thr ou Ser e também como uma sequência terminal em certos gangliósidos.
ZFAT (<i>Zinc Finger And AT Hook Domain Containing</i>)	Difteria e doença autoimune da tireóide/Pode estar envolvido na regulação da transcrição. A super-expressão provoca diminuição da regulação de um número de genes envolvidos na resposta imune.

Continuação da tabela 5.8

KHDRBS3 (<i>KH Domain Containing, RNA Binding, Signal Transduction Associated 3</i>)	Travestismo e epilepsia extratemporal/Proteína de ligação de RNA que desempenha um papel na regulação do splicing alternativo.
COL22A1 (<i>Collagen, Type XXII, Alpha 1</i>)	Age como um ligante de adesão celular para células epiteliais e fibroblastos.
KCNK9 (<i>Potassium Channel, Subfamily K, Member 9</i>)	Síndrome de Birk-Barel e Síndrome alébrica fetal/Ativação de cAMP dependente PKA, atividade homodimerização de proteínas e atividade dos canais de potássio.
TRAPPC9 (<i>Trafficking Protein Particle Complex 9</i>)	Deficiência mental, obesidade, malformações cerebrais e dismorfismo facial/Pode atuar na diferenciação celular neuronal e pode desempenhar um papel no transporte vesicular a partir do retículo endoplasmático para o Golgi.
CHRAC1 (<i>Chromatin Accessibility Complex 1</i>)	Forma um complexo com a DNA polimerase subunidade epsilon (POLE3) e liga-se no dna nu, ao qual é então incorporada cromatina, auxiliado pela actividade remodelação do nucleossoma.
EIF2C2 (<i>Argonaute RISC Catalytic Component 2</i>)	Ligação de mRNA and siRNA.
PTK2 (<i>Protein Tyrosine Kinase 2</i>)	Contratura de cicatriz e adenocarcinoma gastroesofágico/Não-receptor de proteína-tirosina-quinase que desempenha um papel essencial na regulação da migração celular, adesão, disseminação e reorganização do citoesqueleto de actina, formação e desmontagem de adesões focais e protuberâncias celulares, progressão do ciclo celular, proliferação celular e apoptose.
GPR20 (<i>G Protein-Coupled Receptor 20</i>)	Receptor órfão que sinaliza atividades que ativam AMP cíclico.
PTP4A3 (<i>Protein Tyrosine Phosphatase Type IVA, Member 3</i>)	Promove metástase em câncer e podem estar envolvidos na progressão da hipertrofia cardíaca/Proteína-tirosina-fosfatase que estimula a progressão da fase G1 para a fase S, durante a mitose.
BAII (<i>Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1</i>)	Papel importante na supressão de glioblastoma.

Tabela 5.9 Achados clínicos descritos associados a duplicação no segmento cromossômico dup8q24.13-q24.3*

	Referência	#4	DECIPHER													
			1617	1617	1967	2041	2053	250029	250624	251369	253201	256345	257471	258780	263732	
	Gênero	M	F	F	F	F	F	F	M	M	M	F	M	F	F	F
n° de clínicas positivas	Ponto de quebra proximal	q24.13	8q24.21	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.23	8q24.3	8q23.3	8q24.21	8q24.23	8q24.22	8q24.21	8q24.21
	Ponto de quebra distal	q24.3	8q24.21	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.22	8q24.3	8q24.3	8q24.3	8q24.3	8q24.23	8q24.23	8q24.21	8q24.21
	Tamanho da deleção (Mb)	17.18	0.17	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	7.12	1.15	32.40	17.60	0.43	0.50	0.11	1.52
	Região genômica (GRCh38/hg38)	125385074-142496610	128714848-128887986	135378112-135471084	135378112-135471084	135378112-135471084	135378112-135471084	135378112-135471084	139155151-146280020	140016461-141168970	113895032-146294098	128707459-146304022	138796170-139229040	136170993-136669681	130880178-130994958	129790296-131308531
1	Fissura labiopalatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Hemangioma no lábio inferior	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Deficiência intelectual	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5	Convulsões	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Agenesia do corpo caloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Anomalia morfológica do sistema nervoso central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Anormalidade do coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Desenvolvimento da linguagem atrasado	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
13	Atraso no desenvolvimento global	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Atraso no crescimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Cabelos finos	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Cabelo de Implantação baixa na frente	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Clinodactilia do 5° dedo	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Prega palmar transversal única	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Microcefalia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Micrognatia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipermobilidade articular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Atraso motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*banco de dado DECIPHER e ClinGen; M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.9

Referência	DECIPHER														
	263891	265197	265491	267246	269443	282716	285666	287957	288408	288915	289043	289143	289566	290181	290190
Gênero	M	F	M	M	M	M	M	M	M	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R
Ponto de quebra proximal	8q24.21	8q24.21	8q24.22	8q24.13	8q24.22	8q24.21	8q24.3	8q24.13	8q24.22	8q12.1	8q24.13	8q24.3	8q24.22	8q24.22	8q24.3
Ponto de quebra distal	8q24.21	8q24.3	8q24.22	8q24.3	8q24.23	8q24.21	8q24.3	8q24.21	8q24.22	8q24.3	8q24.3	8q24.3	8q24.22	8q24.22	8q24.3
Tamanho da deleção (Mb)	0.30	15.30	1.04	22.02	2.11	0.25	4.76	0.52	0.09	90.24	20.78	4.75	1.03	0.09	0.25
Região genômica (GRCh37/hg19)	130818620-131117120	130978746-146279961	131955654-132994061	124262516-146279990	135637184-137751225	130857383-131107320	141415657-146174033	126828088-127346989	132480039-132565943	56041824-146280167	125498075-146280167	141532950-146280167	131816103-132845148	132480039-132565943	143192740-143443790
Fissura labiopalatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemangioma no lábio inferior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deficiência intelectual	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Agnesia do corpo caloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anomalia morfológica do sistema nervoso central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anormalidade do coração	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desenvolvimento da linguagem atrasado	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Atraso no desenvolvimento global	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Atraso no crescimento	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Cabelos finos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cabelo de Implantação baixa na frente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prega palmar transversal única	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipermobilidade articular	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso motor	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.9.

	DECIPHER		ClinGen									
Referência	294668	306569	nssv576402	nssv576582	nssv576583	nssv579105	nssv581336	nssv582760	nssv3396783	nssv3394929	nssv3395187	
Gênero	F	M	S/R	S/R	S/R							
Ponto de quebra proximal	8q24.3	8q24.3	S/R	S/R	S/R	8q24.21	S/R	S/R	8q22.3	8p21.3	8q21.2	
Ponto de quebra distal	8q24.3	8q24.3	S/R	S/R	S/R	8q24.21	S/R	S/R	8q24.3	8q24.3	8q24.3	
Tamanho da deleção (Mb)	4.63	3.59	0.61	0.37	0.43	0.74	1.05	0.71	44.41	125.14	59.51	
Região genômica (GRCh37/hg19)	141542712-146174033	142685050-146280020	139576001-140186913	132161619-132539748	132782345-133216211	128130585-128870821	142141364-143198733	131042781-131755007	101879571-146295771	21149033-146295771	86778228-146295771	
Fissura labiopalatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Hemangioma no lábio inferior												
Deficiência intelectual	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Convulsões	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agenesia do corpo caloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Anomalia morfológica do sistema nervoso central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Anormalidade do coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Atraso no desenvolvimento global	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
Atraso no crescimento	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Cabelos finos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipertelorismo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cabelo de Implantação baixa na fronte												
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Prega palmar transversal única	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia												
Micrognatia												
Hipermobilidade articular	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso motor	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

5.6 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA DA AMOSTRA #5– dup18p11.32-p11.21

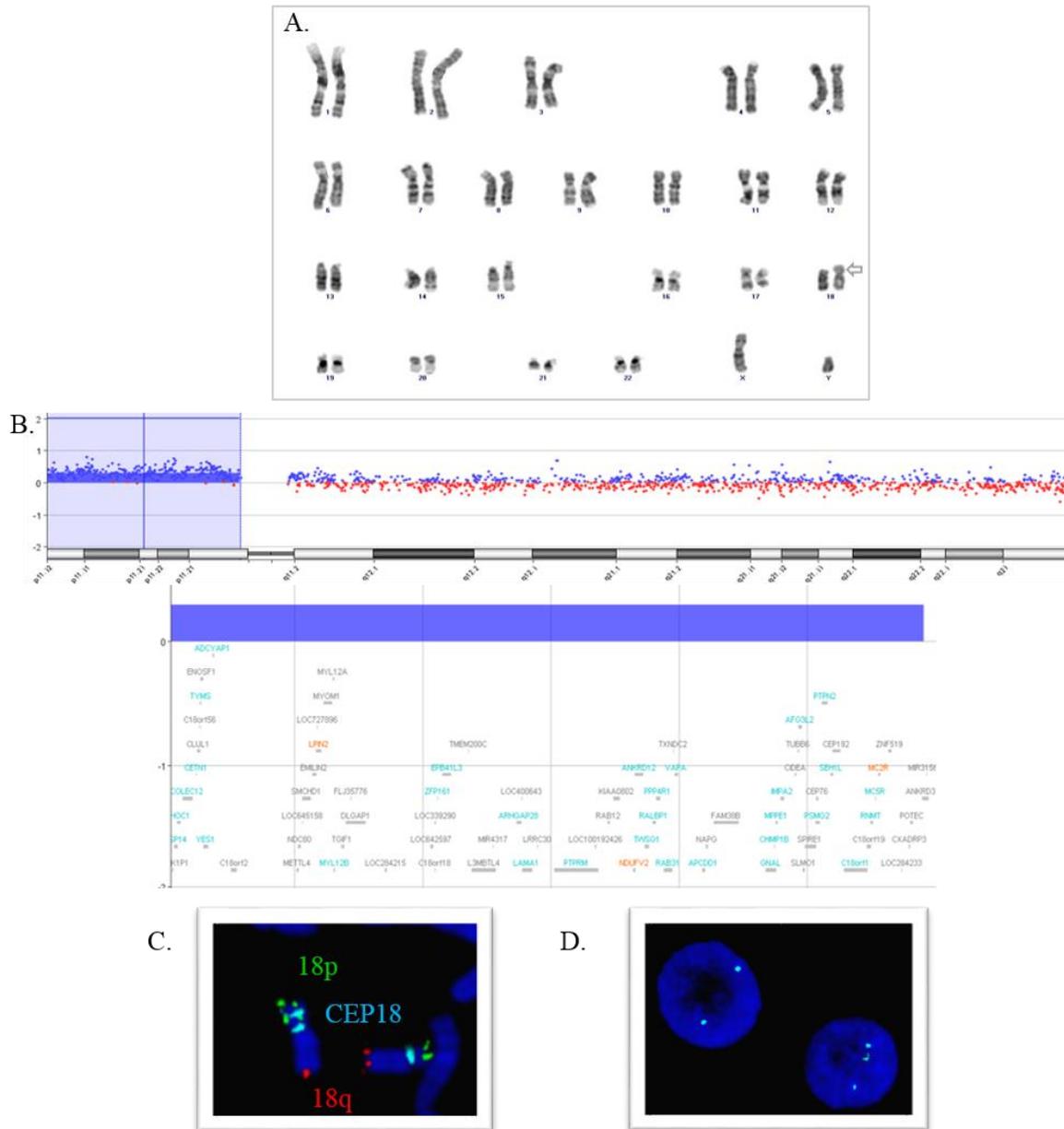


Figura 5.13: Cariótipo por bandamento GTG e representação do perfil cromossômico da amostra #5 com imagem de *array-CGH* utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra o segmento alterado detectado. A barra horizontal (em azul/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Cariótipo evidencia material adicional no braço curto do cromossomo 18 na região p11.2; (B) Acima, *array-CGH* mostra uma duplicação terminal de material genômico do braço curto do cromossomo 18p11.32-p11.21, de ~ 14.75 Mb de tamanho (14,316-14,773,576). Abaixo, perfil gênico da região 18p11.32-p11.21; (C) FISH com sondas CEP18/D18Z1 (sinal aqua), subteloemere 18p/18p11.32 (sinal verde) e subteloemere 18q/18q23 (sinal em vermelho) com padrão de hibridização que evidencia uma duplicação direta do segmento cromossômico (à esquerda); (D) FISH interfásico com a sonda CEP18/D18Z1 (sinal aqua) mostra a presença de mosaïcismo celular com células normais (2 sinais - à esquerda) e células com a presença da duplicação 18p (3 sinais - à direita).



Figura 5.14: (A) e (B). Paciente com dup(18)(p11.32-q11.21) que apresenta dificuldades de aprendizagem, atraso de linguagem, agitação psicomotora e ansiedade.

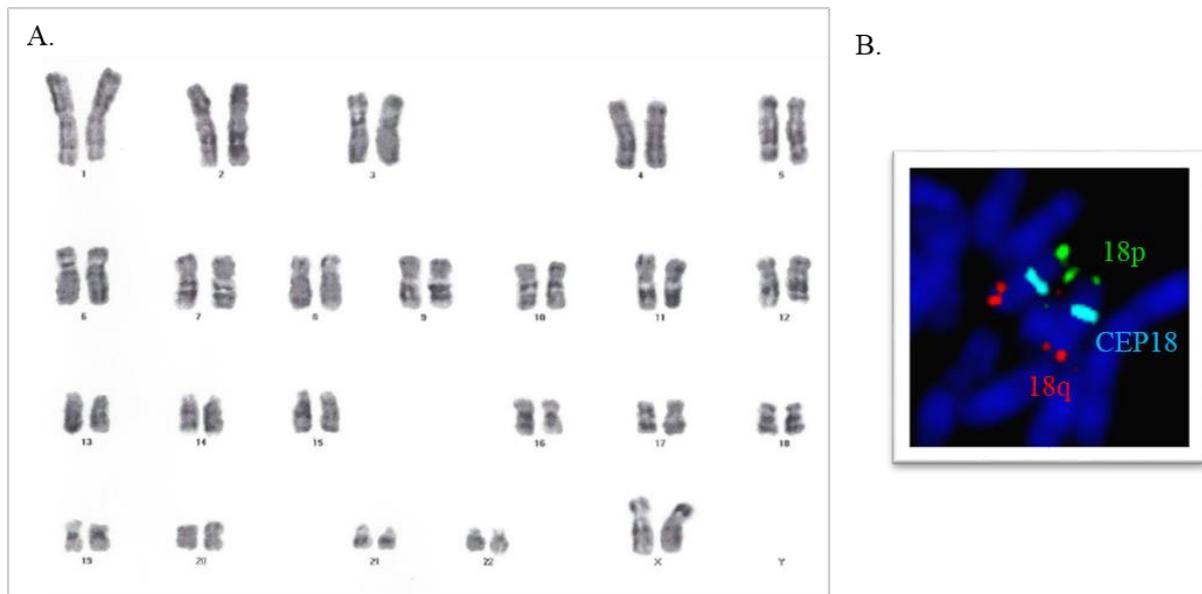


Figura 5.15: Caracterização materna da amostra #5. (A) Cariótipo normal 46,XX; (B) FISH com sondas CEP18/D18Z1 (sinal aqua), subtélomere 18p/18p11.32 (sinal verde) e subtélomere 18q/18q23 (sinal em vermelho) com padrão de hibridização normal.

Tabela 5.10 Caracterização gênômica da região 18p11.32p11.21.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
#5: dup18p11.32p11.21:14,316-14,773,576	
USP14 (<i>Ubiquitin Specific Protease 14</i>)	Cystadenocarcinoma seroso/Deubiquitinase proteasoma associado.
THOC1 (<i>THO Complex Subunit 1</i>)	Necessário para exportação eficiente de RNA poliadenilado.
COLEC12 (<i>Collectin Sub-Family Member 12</i>)	Receptor que exhibe várias funções associadas com a defesa do hospedeiro.
CETN1 (<i>Centrin, EF-Hand Protein, 1</i>)	Desempenha um papel fundamental na estrutura de centro de organização e função de microtúbulos.
TYMS (<i>Thymidylate Synthetase</i>)	Adenocarcinoma gastroesofágico e toxicidade de 5-fluorouracil/Contribui para via de biossíntese de timidato mitocondrial.
ENOSF1 (<i>Enolase Superfamily Member 1</i>)	Síndrome de Rothmund-Thomson / Pode regular a atividade timidilatosintase.
YES1 (<i>V-Yes-1 Yamaguchi Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1</i>)	Megaesôfago e sarcoma / desempenha um papel na progressão do ciclo celular que regula a fase G1, a progressão G2/M e citocinese.
ADCYAP1 (<i>Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1 (Pituitary)</i>)	Síndrome pós-traumática e do túnel do carpo/Estimula adenilato ciclase em células de pituitária e promove o desenvolvimento de projeções neuronais.
NDC80 (<i>NDC80 Kinetochore Complex Component</i>)	Retinoblastoma/Necessário para a segregação dos cromossomas e atividade checkpoint mitótico pela associação do cinetócoro ao complexo NDC80.
SMCHD1 (<i>Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1</i>)	Distrofia muscular Facioscapulohumeral/Necessário para manutenção de inativação do X em mulheres.
EMILIN2 (<i>Elastin Microfibril Interfacer 2</i>)	Poroqueratose de Mibelli e miopia-2/Tem capacidade adesiva celular.
LPIN2 (<i>Lipin 2</i>)	Síndrome Majeed e osteomielite multifocal recorrente crônica/Desempenha papéis importantes no controle do metabolismo de ácidos graxos em níveis diferentes.
MYOM1 (<i>Myomesin 1</i>)	Miopia/Maior componente da banda M miofibrilar em vertebrados.
MYL12B (<i>Myosin, Light Chain 12B, Regulatory</i>)	Saída dupla ventrículo direito/Subunidade reguladora de miosina.
TGIF1 (<i>TGFB-Induced Factor Homeobox 1</i>)	Holoprosencefalia e síndrome de necrose da retina aguda/Fator de transcrição ligado a cromatina e a uma sequência-específica de DNA.
DLGAP1 (<i>Disks Large-Associated Protein 1</i>)	Miopia/Parte do esqueleto pós-sináptico em células neuronais.
C18orf42 (<i>Chromosome 18 Open Reading Frame 42</i>)	Liga-se as subunidades reguladoras da proteína quinase A (PKA) tipo II e pode bloquear a proteína quinase-A (AKAP) mediando a localização subcelular da PKA.
ZFP161 (<i>Zinc Finger Protein Homologous To Zfp161 In Mouse</i>)	Activador transcricional do transportador de dopamina e do repressor de MYC, FMR1 e promotores de timidina-quinase.
EPB41L3 (<i>Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-Like 3</i>)	Adenocarcinoma e meningioma/Supressor de tumor que inibe a proliferação celular e promove a apoptose.
ARHGAP28 (<i>Rho GTPase Activating Protein 28</i>)	GTPases (By similarity).
LAMA1 (<i>Laminin, Alpha 1</i>)	Síndrome Poretti-Boltshauser/Migração e organização de células em tecidos durante o desenvolvimento embrionário.
PTPRM (<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, M</i>)	Envolvido na adesão célula-célula através de interações homofílicas. Pode desempenhar um papel-chave na transdução de sinal e controle de crescimento
RAB12 (<i>Ras-Associated Protein RAB12</i>)	Ligação de GTP e GDP.
GACAT2 (<i>Gastric Cancer-Associated Transcript 2</i>)	Tem expressão regulada negativamente em cânceres gástricos em comparação com os tecidos normais correspondentes.
KIAA0802 (<i>Microtubule Crosslinking Factor 1</i>)	Agregação e estabilização dos microtúbulos em células epiteliais polarizadas e neurônios

Continuação da Tabela 5.10

NDUFV2 (<i>NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Flavoprotein 2</i>)	Transtorno bipolar e esquizofrenia/Funções do complexo I na transferência de elétrons do NADH para a cadeia respiratória.
ANKRD12 (<i>Ankyrin Repeat Domain 12</i>)	Pode recrutar HDACs para o complexo de coativadores P160.
TWSG1 (<i>Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator</i>)	Pode ser um importante modulador do desenvolvimento da cartilagem BMP-regulada e diferenciação de condrócitos. Pode desempenhar um papel no desenvolvimento dos tímócitos (por semelhança)
RALBP1 (<i>Rala Binding Protein 1</i>)	Serve como uma proteína esqueleto que reúne proteínas para formar um complexo endocítico durante a interfase.
PPP4R1 (<i>Protein Phosphatase 4, Regulatory Subunit 1</i>)	Subunidade reguladora da proteína fosfatase serina/treonina.
RAB31 (<i>RAB31, Member RAS Oncogene Family</i>)	Esta família reguladores chave do tráfego intracelular da membrana, a partir da formação de vesículas de transporte para a sua fusão com as membranas e desempenha um papel importante na translocação estimulada por insulina de GLUT4 para a membrana celular.
VAPA (<i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A</i>)	Botulismo e Síndrome de Edwards/Pode desempenhar um papel no tráfego de vesículas.
APCDD1 (<i>Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1</i>)	Hipotricose e Hipotricose simplex/Regulador negativo da via de sinalização Wnt.
NAPG (<i>N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein, Gamma</i>)	Necessária para transporte vesicular entre o retículo endoplasmático e do complexo de Golgi.
FAM38B (<i>Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 2</i>)	Síndrome de Marden-Walker e pseudohipoadosteronismo tipo II
GNAL (<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Activating Activity Polypeptide, Olfactory Type</i>)	Distonia e distúrbio bipolar/Medida transdução de sinal dentro do neuroepitélio olfatório e dos gânglios basais.
CHMP1B (<i>Charged Multivesicular Body Protein 1B</i>)	Envolvidos na citocinese e provável componente periférico associado a triagem endossomal necessária para o complexo transporte III.
MPPE1 (<i>Metallophosphoesterase 1</i>)	Necessária para o transporte a partir do retículo endoplasmático para o Golgi.
IMPA2 (<i>Inositol(Myo)-1(Or 4)-Monophosphatase 2</i>)	Transtorno bipolar e esquizofrenia/Tem sido apontada como o alvo farmacológico para a ação do lítio Li (+) no cérebro.
CIDEA (<i>Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A</i>)	Obesidade/Restringe a lipólise e favorecendo o armazenamento. Quando em sobre-expresso, induz apoptose.
TUBB6 (<i>Tubulin, Beta 6 Class V</i>)	Doença da unha/Principal constituinte dos microtúbulos.
AFG3L2 (<i>ATPase Family Gene 3-Like 2</i>)	Ataxia espinocerebelar e ataxia espástica/Essencial para o desenvolvimento axonal (por semelhança).
PRELID3A (<i>Preli Domain-Containing Protein 3A</i>)	Previsto para funcionar num complexo com a chaperona mitocondrial TRIAP1 para a transferência de fosfolípidos através das membranas mitocondriais.
SPIRE1 (<i>Spire-Type Actin Nucleation Factor 1</i>)	Envolvida no transporte intracelular de vesículas ao longo das fibras de actina.
PSMG2 (<i>Proteasome Assembly Chaperone 2</i>)	Proteína que promove a montagem do proteossoma 20S como parte de um heterodímero com PSMG1.
PTPN2 (<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 2</i>)	Artrite juvenil/Ligação a integrina e às proteínas quinase.
SEH1L (<i>SEH1-Like Protein</i>)	Doença da unha/Componente da subcomplexo Nup107-160 do complexo poro nuclear (NPC).
CEP192 (<i>Centrosomal Protein 192kDa</i>)	Necessário para a montagem do centróssoma e fuso mitótico.
C18orf1 (<i>Chromosome 18 Open Reading Frame</i>)	-
RNMT (<i>RNA (Guanine-7-) Methyltransferase</i>)	Síndrome de Bowen-Conradi e Dubowitz/Metiltransferase <i>capping</i> mRNA.
MC5R (<i>Melanocortin 5 Receptor</i>)	Obesidade/Receptor para MSH (alfa, beta e gama) e ACTH.
MC2R (<i>Melanocortin 2 Receptor (Adrenocorticotrophic Hormone)</i>)	Deficiência de glicocorticóide/Receptor de corticotropina (ACTH).
ANKRD30B (<i>Ankyrin Repeat Domain 30B</i>)	Associada com câncer de mama.

Tabela 5.11 Achados clínicos descritos associados a duplicação no segmento cromossômico 18p11.32-p11.21*

nº de clínicas positivas	Referência	#5	DECIPHER												
			1996	3793	4629	248453	249279	249524	250152	250261	251759	251890	252391	253292	253425
	Gênero	M	M	M	M	F	F	S/R	M	F	M	F	F	F	M
	Ponto de quebra proximal	p11.21	18p11.32	18p11.21	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.31	18p11.31	18p11.21	18p11.31	18p11.23	18p11.23	18p11.21	18p11.32
	Ponto de quebra distal	p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18q23	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.31	18p11.23	18p11.31	18p11.32	18p11.32
	Tamanho da deleção (Mb)	14.75	1.00	14.83	0.03	0.38	78.01	1.82	4.22	14.00	3.49	0.31	0.34	14.59	0.51
	Região genômica (GRCh38/hg38)	14316-14773576	220070-1224564	178428-15008636	237585-270213	148963-533693	10001-78016181	3278738-5093821	237585-4453434	150408-14153337	3595764-7089885	7505903-7817741	6912943-7255921	180229-14773457	756752-1269854
2	Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Ansiedade	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Autismo	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
2	Anormalidade psiquiátrica/comportamental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Agitação psicomotora	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Dificuldade de aprendizagem	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	Deficiência intelectual	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
1	Onfalocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Curto período de atenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Anormalidades no coração	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Desenvolvimento da linguagem atrasado	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	As dificuldades de alimentação na infância	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
19	Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Obesidade	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Baixa estatura	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1	Sindactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	Clinodactilia do 5º dedo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hipotonia muscular	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	Ponte nasal deprimida	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Epicanto	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	Implantação baixa das orelhas	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	Macrocefalia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6	Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* banco de dado DECIPHER e ClinGen; M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.11

Referência	DECIPHER														
	253893	254158	254524	255483	255610	255714	256519	257164	257835	258894	263746	264675	264689	266270	
Gênero	F	M	F	M	M	F	M	M	F	M	M	F	M	S/R	
Ponto de quebra proximal	18p11.21	18p11.21	18p11.22	18p11.21	18p11.23	18q11.1	18p11.21	18p11.32	18p11.1	18p11.32	18p11.32	18p11.21	18p11.31	18p11.32	
Ponto de quebra distal	18p11.22	18p11.23	18p11.31	18p11.22	18p11.31	18p11.32	18p11.21	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.22	18p11.31	18q23	
Tamanho da deleção (Mb)	0.91	4.12	2.68	1.24	1.07	18.53	0.47	0.07	15.39	1.97	0.23	3.60	0.22	77.92	
Região genômica (GRCh37/hg19)	9995330-10900656	8350753-12474137	7094729-9779342	10664423-11904087	6942021-8015631	14116-18540053	12013025-12485964	644928-711793	11542-15401751	180229-2152396	363234-597813	9593755-13195447	3458329-3679368	83701-78001525	
Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ansiedade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Autismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidade psiquiátrica/comportamental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agitação psicomotora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Deficiência intelectual	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Onfalocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Curto período de atenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidades no coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
As dificuldades de alimentação na infância	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Sindactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Macrocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.11

	DECIPHER														
Referência	266406	267280	268344	269182	269434	272200	272656	274293	275482	276691	279086	280041	281397	281466	
Gênero	F	M	M	F	M	F	M	M	M	M	M	M	F	M	
Ponto de quebra proximal	18p11.32	18p11.21	18p11.21	18p11.21	18p11.23	18q12.1	18p11.21	18p11.22	18p11.31	18p11.23	18p11.21	18p11.32	18p11.31	18p11.21	
Ponto de quebra distal	18p11.32	18p11.23	18p11.22	18p11.23	18p11.31	18p11.32	18p11.31	18p11.22	18p11.32	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.32	
Tamanho da deleção (Mb)	0.45	4.52	0.31	4.87	1.14	27.39	7.17	0.12	3.84	0.73	13.93	0.38	5.93	14.72	
Região genômica (GRCh37/hg19)	2152137-2606609	8359098-12879749	10669055-10974860	7108955-11979373	6936251-8080357	14316-27403081	4562731-11734780	9416583-9538065	1-3844647	7094728-7821400	148993-14081858	352578-729030	352803-6278431	14316-14733870	
Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Ansiedade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Autismo	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidade psiquiátrica/comportamental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agitação psicomotora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Deficiência intelectual	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
Onfalocèle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Convulsões	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
Curto período de atenção	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidades no coração	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
As dificuldades de alimentação na infância	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipertelorismo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrognatía	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sindactília	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clinodactília do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Macrocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.11

	DECIPHER														
Referência	281471	283077	283248	283424	283447	284092	284968	285394	285404	285757	287223	288624	289335	289604	
Gênero	F	M	M	M	F	F	M	F	M	M	M	S/R	S/R	S/R	
Ponto de quebra proximal	18p11.21	18p11.21	18p11.31	18p11.21	18p11.32	18p11.31	18p11.21	18p11.23	18p11.23	18p11.31	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.32	
Ponto de quebra distal	18p11.32	18p11.32	18p11.31	18p11.21	18q23	18p11.32	18p11.21	18p11.23	18p11.31	18p11.31	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.32	
Tamanho da deleção (Mb)	14.72	14.59	2.06	0.06	78.00	4.39	0.23	0.42	1.11	0.43	0.32	0.58	0.27	1.14	
Região genômica (GRCh37/hg19)	14316-14733870	142096-14733870	3648271-5709075	13871404-13935908	11543-78015058	1-4391015	12596283-12825684	7821371-8245748	6942021-8055875	3332742-3762681	3066990-3389619	1652653-2233823	416561-683796	78425-1216488	
Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ansiedade	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Autismo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Anormalidade psiquiátrica/comportamental	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Agitação psicomotora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Deficiência intelectual	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	
Onfalocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Curto período de atenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidades no coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
As dificuldades de alimentação na infância	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Forma facial anormal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Sindactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Macrocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.11

Referência	DECIPHER							ClinGen							
	289621	289874	289990	289998	290347	290361	291517	nssv576007	nssv578752	nssv578754	nssv578757	nssv578762	nssv578768	nssv578770	
Gênero	S/R	S/R	S/R	M	S/R	S/R	M	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	
Ponto de quebra proximal	18p11.32	18q12.1	18p11.32	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.32	S/R	18p11.21	18p11.32	18p11.32	18p11.32	18p11.21	18p11.22	
Ponto de quebra distal	18q23	18p11.32	18p11.32	18p11.31	18p11.32	18p11.32	18p11.32	S/R	18p11.32	18q11.1	18p11.32	18q23	18p11.31	18p11.23	
Tamanho da deleção (Mb)	77.93	27.30	0.53	0.13	0.09	0.09	0.46	1.08	15.37	18.47	0.14	77.85	10.69	1.77	
Região genômica (GRCh37/hg19)	78425-78012819	78425-27377975	78425-605234	3054927-3189138	1997931-2091568	1997931-2091568	363234-825147	6973010-8055875	10001-15380683	53345-18528464	148763-293736	148963-78002264	3389360-14082028	7542603-9320892	
Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ansiedade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Autismo	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	
Anormalidade psiquiátrica/comportamental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agitação psicomotora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Deficiência intelectual	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Onfalocèle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Convulsões	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Curto período de atenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidades no coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
As dificuldades de alimentação na infância	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso global no desenvolvimento	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Baixa estatura	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Forma facial anormal	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrognatía	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sindactília	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clinodactília do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Estrabismo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Macrocefalia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; Retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

Continuação da Tabela 5.11

Referência	ClinGen												
	nssv579457	nssv580954	nssv581642	nssv583076	nssv706211	nssv1604635	nssv1605071	nssv3396980	nssv1608171	nssv1608173	nssv1609686	nssv3397437	
Gênero	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	
Ponto de quebra proximal	S/R	S/R	S/R	18p11.21	18p11.32	18q11.2	18p11.31	18q11.2	18p11.21	18p11.32	18p11.21	18p11.21	
Ponto de quebra distal	S/R	S/R	S/R	18p11.32	18p11.32	18p11.22	18p11.32	18p11.21	18p11.32	18q23	18p11.32	18p11.32	
Tamanho da deleção (Mb)	0.49	0.95	0.32	9.47	2.07	13.48	5.30	7.64	13.97	77.89	15.03	15.06	
Região genômica (GRCh37/hg19)	7115075-7608218	829996-1782084	374344-699626	2425506-11904117	148963-2221286	8779841-22265343	149089-5458471	13340111-20989843	118760-14089409	118760-78012829	136226-15175005	136226-15198990	
Fissura de lábio e palato bilateral	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ansiedade	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Autismo	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	
Anormalidade psiquiátrica/comportamental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agitação psicomotora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dificuldade de aprendizagem	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
Deficiência intelectual	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
Onfalocèle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Curto período de atenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Anormalidades no coração	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Desenvolvimento motor atrasado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
Desenvolvimento da linguagem atrasado	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
As dificuldades de alimentação na infância	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atraso global no desenvolvimento	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	
Obesidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Baixa estatura	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Forma facial anormal	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
Hipertelorismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micrognatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Sindactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Hipotonia muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ponte nasal deprimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Implantação baixa das orelhas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Macrocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Microcefalia	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	

M: masculino; F: feminino; S/R: sem registro; “+”: presente; “-”: ausente; retângulo cinza: clínica correspondente ao caso descrito neste trabalho.

CAPÍTULO 5
DISCUSSÃO

Rearranjos cromossômicos estruturais são decorrentes de quebras de cadeia dupla de DNA em diferentes pontos nos cromossomos e junção das extremidades quebradas de forma incorreta. Essas alterações podem resultar de diferentes mecanismos que incluem os eventos de recombinação, replicação e reparo do DNA. Erros durante os mecanismos de reparação podem resultar em variações genômicas estruturais que envolvem perdas, ganhos e rearranjos de sequências que variam desde nucleotídeos a segmentos cromossômicos inteiros. Dentre os rearranjos estruturais em desequilíbrio mais comuns estão as deleções e duplicações cromossômicas que são o produto da modificação da estrutura do DNA, o que pode levar a perda ou ganho de sequências de DNA, disrupção gênica ou a perturbação de elementos regulatórios do genoma. Em decorrência desses eventos, existem múltiplas possibilidades da ocorrência de rearranjos no genoma que podem resultar em alterações associadas a quadros clínicos com espectro muito variável.

Na última década, a importância do desenvolvimento tecnológico aplicado pela citogenética para detecção e caracterização de rearranjos cromossômicos que levam a quadros clínicos patológicos tem sido demonstrada. O desenvolvimento de técnicas aplicadas à citogenética clássica e molecular têm permitido uma detecção cada vez mais sensível de rearranjos cromossômicos, incluindo deleções e duplicações relacionados a distúrbios genômicos. Alguns dos métodos aplicados à citogenética que podem ser combinados no estudo de cromossomos, incluem a análise por meio de cariótipo, Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array-CGH) e SNP-arrays (Riegel, 2014; Riegel *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi de caracterizar, por meio de métodos aplicados a citogenômica, rearranjos cromossômicos estruturais patogênicos (deleções e duplicações) associadas a quadros clínicos de dismorfias e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor em amostras armazenadas em um repositório de material biológico. Além disso, este estudo visou classificar os diferentes tipos de variantes cromossômicas estruturais detectadas e estimar a relevância clínica de ganhos e perdas de sequências do genoma envolvidos na formação de rearranjos cromossômicos estruturais.

Para caracterizar rearranjos estruturais envolvendo deleções e duplicações cromossômicas, investigamos três amostras com deleções envolvendo os cromossomos 3q, 6p e 18q, respectivamente. Nas duas amostras com duplicações, uma duplicação envolvendo o cromossomo 8q e uma duplicação terminal no cromossomo 18p foram avaliadas (Tabela 5.1). Utilizamos além de métodos de citogenética clássica, FISH e plataformas de oligonucleotídeos sintéticos (*oligoarrays*), o que permite que se possa detalhar com maior definição o tamanho,

a localização e os pontos de quebras de uma deleção ou duplicação cromossômica. Esta definição nos permitiu pesquisar sobre a presença de LCRs nos pontos de interrupção de uma alteração estrutural, fornecendo informações sobre o mecanismo de reparo que possivelmente contribuiu para a formação dos rearranjos cromossômicos estudados.

Entre os casos com rearranjos cromossômicos estruturais caracterizados neste estudo, em duas amostras (amostra 2 e amostra 3) as alterações foram originadas *de novo* e em outras duas amostras as alterações foram de origem materna (amostra 1 e amostra 4) (Tabela 5.1). Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de distinguir desequilíbrios *de novo* dos desequilíbrios herdados devido à indisponibilidade de DNA dos progenitores em todas as amostras. Devido à indisponibilidade de material paterno, não foi possível distinguirmos a origem da alteração cromossômica observada na amostra 5 (dup18p). Variações *de novo* em regiões clinicamente significantes são mais prováveis de serem causadoras diretas de patologia. No entanto, nas alterações hereditárias, deve-se considerar a expressividade variável e penetrância incompleta de uma mesma alteração presente em indivíduos de uma mesma família. Estudos em progenitores devem ser recomendados para indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos estruturais, para determinar se esses representam eventos *de novo* ou se foram herdados.

Em nosso estudo, entre as três amostras com deleções, em duas delas (amostra 2 e amostra 3) o rearranjo cromossômico foi classificado inicialmente pela análise de cariótipo como uma deleção terminal. Na amostra 1, a alteração foi classificada como uma deleção intersticial do cromossomo 3, herdada da mãe, envolvendo o segmento q11.2. A caracterização citogenômica por *array*-CGH na amostra do paciente e de sua mãe confirmou a perda de material genômico correspondendo a uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 3 na região q11.2-q13.31 (Figura 5.1). Já é evidente a partir da análise do cariótipo que uma grande deleção (> 16Mb) possa envolver muitos genes com expressão relevante associada às manifestações clínicas observadas nos portadores. O caso índice, sexo feminino, foi encaminhado para uma avaliação clínica aos 6 anos de idade, apresentando microcefalia, fendas palpebrais para cima, raiz nasal larga, nariz com ponta bulbosa, palato alto, colestase, persistência do canal arterial e distúrbios de linguagem (Tabela 5.1). Sua mãe, 28 anos, apresentou hipertelorismo ocular, fissuras palpebrais oblíquas para cima, hipoplasia média facial, hipoplasia das asas do nariz, pescoço triangular, tórax estreito, concavidade lombar e unhas com descolamento subungueal. Apresenta dificuldades de aprendizagem e relata uso de prótese desde os 15 anos por apresentar perda dentária.

Embora as características fenotípicas relacionadas com a amostra 1 estejam dentro do espectro de características clínicas associadas às deleções parciais ou completas da região 3q11.2-q13.31, não existem casos relatados com colastase (Tabela 5.3). Devido a colastase familiar relatada, a paciente apresentava o diagnóstico de deficiência de α -1-antitripsina (AATD) (Laurell & Eriksson, 1963), uma condição com um padrão de herança autossômico co-dominante. Essa doença pode causar problemas pulmonares e hepáticos que afetam cerca de 1 em cada 1.500 a 3.500 indivíduos com ascendência européia. Diante disso, deve-se considerar que a presença da deleção 3q11.2-q13.31 estaria co-segregando com uma outra condição genética e o que pode contribuir para a expressividade variável observada nesta família. Deve-se ainda considerar que mesmo em indivíduos com pontos de quebra cromossômicos similares, dentro de uma mesma região genômica, podem ocorrer mecanismos moleculares levando a uma ativação gênica diferente. A indisponibilidade de amostra de DNA materno impossibilitou uma caracterização mais precisa da deleção que está segregando nesta família.

A amostra 2 apresentou uma deleção de 9.62 Mb que se estende de 6p24.3 a p22.3 *de novo*. Ao exame clínico, aos 8 anos de idade, o paciente apresentava retardo de crescimento, hipoplasia cerebral, microftalmia e nistagmo (olho esquerdo), estrabismo, fissura de palato submucosa com lábio leporino unilateral à direita, micrognatia severa, fibrilação e defeito do septo ventricular e pé torto unilateral à esquerda. Esta região contém mais de 29 genes, incluindo o gene *TFAP2A* e, incluindo parcialmente o gene *OFC1* (*Orofacial Cleft 1*). Mutações em *TFAP2A* estão associadas à síndrome Brânquio-óculo-facial (Milunsky *et al.*, 2008; Milunsky *et al.*, 2011; Meshcheryakova *et al.*, 2015), uma doença rara de herança autossômica dominante, caracterizada por defeitos branquiais, fissura de sinusite, anomalias oculares e dismorfismo facial, incluindo lábio leporino, palato fendido ou pseudofendido.

Apenas em casos esporádicos têm sido relatadas aberrações cromossômicas crípticas envolvendo deleções do gene. Dumitrescu *et al* 2012, detectou uma deleção cromossômica críptica de 3.2 Mb em uma mãe afetada e seu filho no cromossomo 6p24.3, permitindo a provável localização cromossômica do gene candidato. Rearranjos cromossômicos esporádicos, mesmo quando encontrados em uma pequena percentagem de casos, podem fornecer informações sobre a região de localização de um gene candidato associado a um fenótipo. Embora em nosso estudo tenhamos encontrado uma deleção maior de 9,62 Mb envolvendo além de *TFPA2A*, outros genes contíguos no mesmo segmento, é provável que o gene *TFPA2A* tenha uma maior contribuição ao fenótipo associado com a del6p24.3-p22.3 avaliada neste trabalho.

Na amostra 3, a deleção demonstrada (18q21.2-q23~~dn~~) foi primeiramente classificada como uma deleção terminal incluindo a região subteloômérica. Além da deleção 18q identificada nesta amostra, a análise por FISH evidenciou a ocorrência de uma inversão pericêntrica abrangendo o segmento q21.2-q23, e sem o envolvimento da região terminal 18qter (Fig. 5.6.E). A caracterização citogenômica por *array*-CGH evidenciou a perda de material genômico correspondendo a uma deleção intersticial de 26.61 Mb no braço longo do cromossomo 18q21.2-q23 (Fig. 5.6.B e C). A portadora, aos 3 anos de idade, apresentava microcefalia, hipoplasia cerebral, estreitamento bitemporal, epicanto, polegares longos, fosseta sacal e hipotonia. Apresentava ainda atraso neuropsicomotor e movimentos estereotipados. As informações citogenômicas e clínicas sugerem uma associação com a síndrome de Pitt-Hopkins [Pitt e Hopkins, 1978]. A síndrome de Pitt-Hopkins (PTH, MIM # 610954) é causada por haploinsuficiência do gene *TCF4*, localizado na região 18q21.2, devido a deleções e mutações *de novo* nessa região.

Não existe uma correlação genótipo-fenótipo evidente no que diz respeito as deleções intragênicas ou mutações pontuais envolvendo o gene *TCF4* (Peippo & Inácio, 2012). A hemizigosidade em relação a *TCF4* confere um impacto significativo, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento cognitivo e motor, resultando em um prognóstico muito diferente quando comparados aos indivíduos hemizigotos para outras regiões do segmento 18q distal. Têm sido relatado que indivíduos com deleções maiores e haploinsuficiência de *TCF4* apresentam uma maior sobrevida e sintomas mais brandos (Marangi *et al.*, 2011).

Na amostra 4 foi identificada uma duplicação no braço longo do cromossomo 8 [cariótipo 46,XY,del8q24], que foi visualizada na análise cromossômica por bandamento GTG (Fig. 5.9.A). Essa alteração está presente no paciente e em sua mãe. Os pontos das quebras cromossômicas que originaram a duplicação foram identificados usando-se *array*-CGH, delimitando-se um segmento intersticial duplicado de cerca de 17.18 Mb em 8q24.13-q24.3 (Figura 5.9B). FISH com as sondas *MYC* / 8q24.21 e *GSDMC* / 8q24.1 confirmou a duplicação identificada por *array*-CGH. Além dessa, a análise por FISH revelou a ocorrência de uma inversão no braço longo do cromossomo 8 (Figuras 5.9.D e 5.9.E).

A maioria das duplicações intersticiais estão em *tandem* e na orientação direta no que diz respeito ao loci original. No entanto, a localização do material adicional requer uma análise mais detalhada. FISH com a utilização de sonda(s) na região duplicada muitas vezes pode mostrar a localização genômica do material adicional, identificando uma duplicação em *tandem* ou um evento de duplicação inversão, como evidenciamos na amostra 4 (Fig. 5.9.D). Duplicações invertidas geralmente fazem parte de rearranjos mais complexos, incluindo

translocações de inserção e duplicações invertidas adjacentes a deleções terminais (Newman *et al.*, 2015).

Duplicações intersticiais são muitas vezes herdadas dos pais. Em nosso estudo, a duplicação é de origem materna. A mãe do paciente exibiu fenda palatina, característica clínica não relatada no probando (Tabela 1), apresentando dificuldade de aprendizado. Sendo assim, o prognóstico para futuras gestações considerando a ocorrência de eventos epigenéticos, a penetrância incompleta e a expressividade variável que pode ocorrer em indivíduos de uma mesma família, dificultam um aconselhamento genético. A natureza altamente variável do genoma significa que é preciso ter cuidado na atribuição de patogenicidade para rearranjos cromossômicos herdados.

Em relação à fenda labiopalatina, deve-se considerar que aproximadamente 30% dos casos com fenda labiopalatina e 50% dos casos de fenda palatina são reconhecidos como componentes de síndromes de malformações congênitas (Stanier *et al.*, 2004). No entanto, ambos os fatores genéticos e ambientais são conhecidos por contribuir para a ocorrência de fenda labiopalatina, dificultando a elucidação dos mecanismos causais. Deleções associadas ao gene *OFC12* (*Cleft Lip With or Without Cleft Palate, Nonsyndromic, 12*), o qual está parcialmente localizado na região cromossômica 8q24.38q24.3, têm sido relatado associado a fissuras labiopalatinas não síndrômicas (Ludwig *et al.*, 2012). Neste caso, a disrupção do gene com sua posterior inversão poderia levar a haploinsuficiência, por produzir uma proteína atípica, ou não funcional, se o ponto de quebra cair na parte que codifica o sítio ativo ou em algum sítio de *splicing*. Se este for também um local de crossing-over (Fig. 6.1), o ponto de quebra pode estar diferindo entre mãe e filho o que, devido a capacidade de detecção do aCGH (40kb), poderia não ser evidenciado. Ainda assim, não podemos excluir em nosso estudo que essa condição esteja presente devido a um evento independente desta alteração cromossômica estrutural.

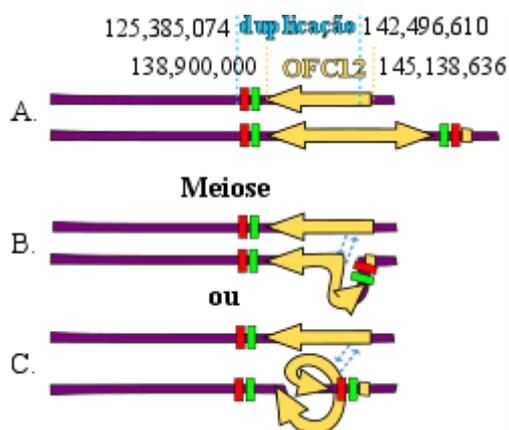


Figura 6.1: A. Esquema do gene *OFC12* [coordenadas genômicas: (GRCh38): 8:138,900,000-145,138,636 - 8q24.38q24.3], parcialmente duplicado e invertido apartir dos pontos de quebra [(GRCh38): 8:125,385,047-142,496,610], restando uma porção intacta (142,496,610-145,138,636); B. Esquema de meiose com pareamento na primeira sequencia; C. Esquema de meiose com pareamento na sequencia invertida.

Por fim, discutimos a duplicação 8p11.32-18p11.21 caracterizada na amostra 5. A deleção deste segmento foi descrita como uma alteração estrutural rara, descrita pela primeira vez em 1968 (Jacobsen & Mikkelsen, 1968). A trissomia parcial *pura* do braço curto do cromossoma 18 permanece uma alteração estrutural rara associada às características dismórficas moderadas, com aproximadamente 27 casos publicados (Orendi *et al.*, 2013). As anomalias físicas associadas à trissomia parcial do cromossomo 18p são inespecíficas, com características faciais menores ou características físicas normais como relatado em nosso estudo (Tabela 5.1). A deficiência intelectual não está presente em cerca de um terço dos pacientes e em 59 %, há uma associação com deficiência intelectual leve ou atraso de desenvolvimento.

Na maioria dos casos de dup18p, o material adicional extra observado no braço curto do cromossomo 18 é derivado de uma duplicação segmental 18p, sendo que o mesmo evento se observa em nosso estudo (Grosso *et al.*, 2005; Marical *et al.*, 2007). Além da duplicação direta identificada nesta amostra, a análise por FISH evidencia a presença de mosaïcismo celular, com 60% de células normais e 40% de células com a presença de dup8p. A análise por array-CGH da mesma maneira, detecta a presença de mosaïcismo para a região crítica. Um mosaïcismo celular com um maior número de células normais, poderia estar associado a um fenótipo mais brando devido a presença de um maior número de células sem a trissomia 18p.

Muitos casos de doenças genômicas são causadas por deleções, enquanto que duplicações e inversões parecem ser menos comuns. Como as deleções causam em geral um fenótipo mais severo, elas seriam mais frequentemente detectadas e, portanto seriam mais identificadas e relatadas do que duplicações e inversões. A origem de síndromes de microdeleção/duplicação recorrentes é mediada pela recombinação homóloga não alélica (NAHR), flanqueada por LCRs (*low copy repeats*), predominantemente durante a meiose (Gu *et al.*, 2008). Em nosso estudo, consideramos que um rearranjo em desequilíbrio tenha sido originado por NAHR, se mediado por LCRs em ambos os intervalos do ponto de quebra. Consideramos, no entanto, que um desequilíbrio origina-se por um mecanismo diferente do NAHR se LCRs estão ausentes em ambos ou em uma das extremidades nos intervalos do ponto de quebra.

Na amostra 1 (del3q11.2-q13.31) e amostra 2 (del6p24.3-p22.3), LCRs estavam presentes em apenas um intervalo de ponto de interrupção. Nesses casos sugerimos que os rearranjos tenham se originado por um mecanismo diferente de NAHR. Importante ressaltar nestes casos que não foi feito o sequenciamento dos pontos de quebra, podendo haver alguma mutação que desencadeie NAHR o que não nos permite excluir este mecanismo, entretanto a análise nos leva a crer que a alteração tenha se originado por SRS, mecanismo similar a FoSTeS

que ocorre em uma forquilha de replicação adjacente (Fig. 6.2). Esses achados estão de acordo com a formação de desequilíbrios cromossômicos não-recorrentes, que apresentam uma maior heterogeneidade em relação aos pontos de quebra do que os rearranjos recorrentes.

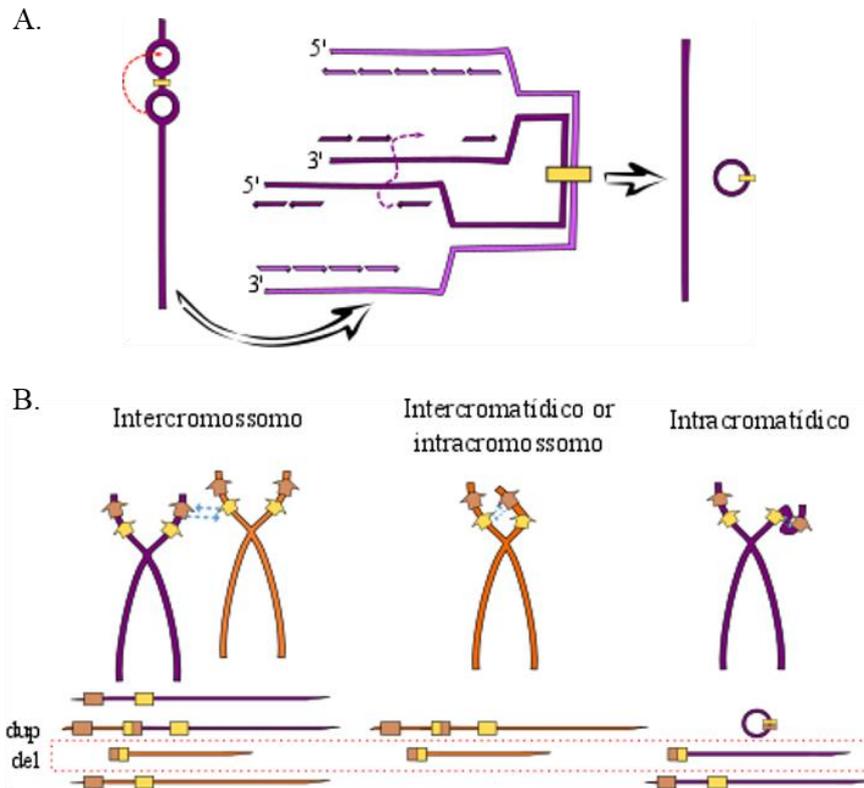


Figura 6.2: Mecanismos propostos para as amostras 1 (del3q11.2-q13.31) e 2 (del6p24.3-p22.3). (A) Esquema mostrando SRS em uma forquilha de replicação localizada distalmente na fita de mesma orientação resultando na deleção da região entre as forquilhas envolvidas (B) NAHR intercromossômica, intercromatídica e intracromatídica, ambas desencadeando o mesmo padrão de deleção.

Baseado nos modelos propostos de formação de rearranjos cromossômicos, propõe-se que NAHR é o mecanismo de origem que poderia estar associado a formação do rearranjo inv del 18q21.2-q23 observado na amostra 3 (Fig. 6.3.A) e na amostra 5 (dup18p11.32-18p11.21), sendo esta resultante mais especificamente de BIR, mecanismo no qual há cópia da porção final do cromossomo a partir da região de rearranjo (Fig. 6.3.B). Propõe-se ainda, que SRS poderia estar associado a formação da inversão duplicação não recorrente identificada na amostra 4 (inv dup 8q24.38q24.3) (Fig. 6.3.C). Entretanto, apenas uma investigação molecular dos pontos quebra com métodos de maior resolução pode fornecer informações que confirmem quais os mecanismos de origem responsáveis pela formação dos rearranjos estruturais investigados neste estudo.

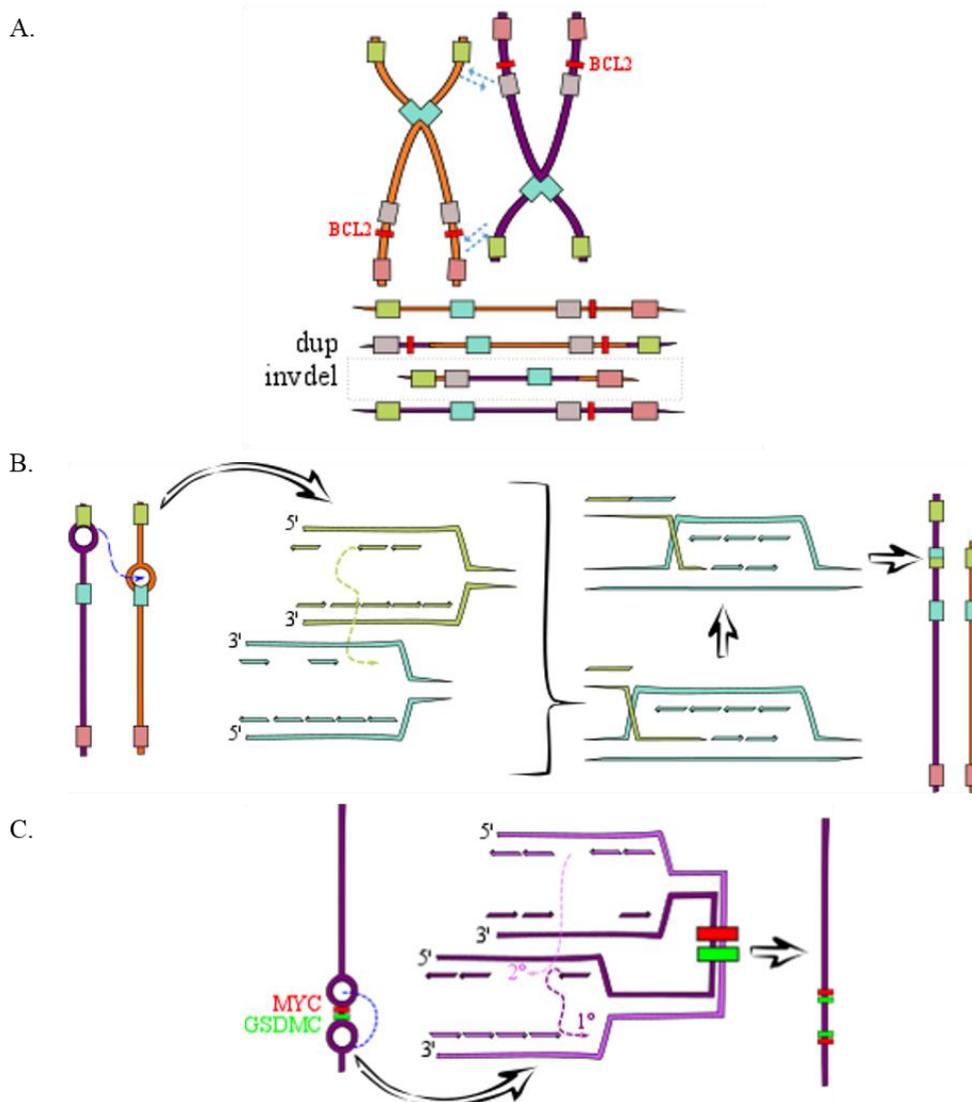


Figura 6.3: Mecanismos propostos para as amostras 3 (inv del 18q21.2-q23), 4 (inv dup 8q24.38q24.3) e 5 (dup18p11.32-18p11.21). (A) Esquema mostrando NAHR entre sequências em orientação oposta, resultando em inversão com perda de um segmento intersticial; (B) Esquema de BIR entre sequências pericentroméricas e subteloômicas resultando na duplicação de todo o braço curto do cromossomo, como observado na amostra estudada; (C) Esquema de SRS com dois deslizamentos, sendo o primeiro para a fita contrária da própria forquilha, copiando inversamente o segmento entre as forquilhas, e o segundo deslizamento para que esta volte a posição original.

A enorme variedade de rearranjos que afetam alguns clusters de duplicação no genoma humano, incluindo os de ganhos e perdas parciais, implica que muitos dos rearranjos correspondentes são transposições recentes, enfatizando a alta plasticidade genômica em regiões de duplicação segmentar (Goidts *et al.*, 2006). Esse fator torna, em muitas situações, difícil a interpretação do significado clínico das duplicações segmentais e a determinação de seus mecanismos de origem. A grande quantidade de informações clínicas e citogenéticas disponíveis em bancos de dados de acesso livre auxiliam a decifrar as combinações de variantes estruturais que levam a diferentes graus de patogenicidade. Fatores que influenciam a

patogenicidade de deleções e duplicações, e uma classificação baseada em evidências para a interpretação clínica de variações no genoma, têm sido amplamente discutidos e propostos (Lee *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Riggs *et al.*, 2012). Entretanto, não existe ainda uma diretriz diagnóstica universal para avaliar as consequências clínicas das inúmeras combinações de variantes possíveis.

Uma melhor caracterização de alterações genômicas detectadas com o uso de array-CGH evidencia a maior sensibilidade e especificidade desse método, quando comparada com outros métodos de citogenética clássicos, no presente estudo e em outros (Nevado *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015; Dorfman *et al.*, 2014; Riegel *et al.*, 2015). Entre as vantagens da análise citogenômica por *array*-CGH, estão as de não ser necessária a obtenção de cromossomos metafásicos e a maior sensibilidade, uma vez que é capaz de detectar em amostras de DNA qualquer rearranjo cromossômico em desequilíbrio, além da identificação de *loci* ou genes candidatos associados à doenças genômicas. A maior desvantagem da utilização de *array*-CGH é a de não detectar rearranjos cromossômicos equilibrados, como as translocações balanceadas e inversões. Fato esse demonstrado em nosso estudo, uma vez que as inversões associadas a deleção presente na amostra 3 e a duplicação presente na amostra 4, não foram detectadas por *array*-CGH.

Interpretar os efeitos fenotípicos de variações genômicas estruturais continua a ser um desafio, em parte devido ao nosso conhecimento incompleto de genes em que metade de uma dose é prejudicial (haploinsuficiência) ou em que tanto o aumento ou diminuição da dose do gene é prejudicial.

Na análise dos dados obtidos neste trabalho, observamos a interpretação inicial por meio de cariótipo de um deleção terminal, que de fato mostrou ser uma deleção intersticial na posterior análise por *array*-CGH (amostra 3, del18q21.2-q23). Na amostra 4 (dup8q24.13-q24.3), a interpretação inicial por meio de cariótipo foi sugestiva de uma duplicação terminal direta na região 8q24.13. A posterior investigação por meio de *array*-CGH evidenciou a presença de uma deleção intersticial envolvendo a região 8q24.13-q24.3. Em ambos os casos, uma inversão cromossômica adicional, além da deleção del18q21.2-q23 e da dup8q24.13-q24.3, respectivamente, foi identificada apenas pelo método de FISH.

Apesar de todos os avanços tecnológicos ocorridos na área da citogenética molecular e o desenvolvimento de *arrays* de alta resolução, o exame de cariótipo e a análise por FISH, continuam ferramentas fundamentais para avaliar os rearranjos cromossômicos como inversões e translocações equilibradas. É possível que mais de uma alteração cromossômica possa ocorrer no genoma de um mesmo indivíduo. O reconhecimento de uma variação genômica patogênica

pode trazer em um primeiro momento a informação causal para o fenótipo de um indivíduo. No entanto, uma análise mais detalhada ou de maior resolução pode revelar uma alteração adicional inesperada ou outro rearranjo estrutural relevante para a condição clínica que se apresenta. Nosso estudo reforça a importância que o uso em combinação de diferentes instrumentos da biologia molecular aplicados à citogenética é necessário para a identificação e caracterização de variações genômicas estruturais, o que deve contribuir para um melhor entendimento das consequências patogênicas de alterações cromossômicas em humanos.

CAPÍTULO 6
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma pesquisa científica direcionada à citogenética humana, além de promover o desenvolvimento técnico-científico no país, permite estabelecer o diagnóstico citogenético e clínico em muitos casos de malformações congênitas, atraso neuropsicomotor e deficiência intelectual. A partir das informações geradas neste trabalho, foi possível elucidar a origem da alteração genômica dos portadores de rearranjos estruturais avaliados. Em consequência, os resultados obtidos através da caracterização citogenômica auxiliaram a delinear o fenótipo associado à alteração críptica específica, colaborando para a identificação dos genes associados a cada condição.

Deleções e duplicações patogênicas podem variar em tamanho desde milhares a centenas de milhares de pares de bases de comprimento e podem exigir tecnologias especializadas para sua visualização. Cada metodologia utilizada para o estudo de variações estruturais do genoma possui aplicabilidade específica e apresenta suas limitações. O desenvolvimento contínuo de técnicas de análise citogenômica têm permitido a identificação e caracterização de rearranjos cromossômicos complexos que contribuem para o entendimento da origem e formação das variações genômicas estruturais. Além disso, a aplicação de diferentes metodologias, desde estudos citogenéticos clássicos, como por exemplo o cariótipo, juntamente com a análise citomolecular com métodos como FISH e array-CGH, pode permitir um diagnóstico preciso para diversas doenças genômicas que decorrem de alterações cromossômicas estruturais.

A possibilidade de identificação de loci e/ou genes candidatos nas amostras incluídas neste projeto permitiu um registro atualizado do genótipo dos portadores, o que contribuiu para uma melhor compreensão da etiologia da amostra estudada e permitiu a obtenção de mapas genéticos de alta densidade.

A execução dessas análises e o estudo de rearranjos cromossômicos estruturais permite inferir um prognóstico a curto e longo prazo, além de contribuir para uma avaliação do risco de recorrência no contexto do aconselhamento reprodutivo, podendo tornar disponível a identificação do portador, bem como o diagnóstico pré-natal. Desta maneira os indivíduos portadores e seus familiares poderão ser encaminhada à serviços médicos e sociais adequados, incluindo grupos de apoio.

Sendo assim, este trabalho confirma e amplia estudos anteriores que destacam a importância da investigação citogenômica para a identificação de fatores genéticos determinantes no desenvolvimento das variações estruturais associadas à doenças genômicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto et al (2006) Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 16: 851-5.

Arlt MF, Wilson TE, Glover TW (2012) Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev* 22:204-210.

Arnold J (1879) Beobachtungen über Kernteilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Arch Pathol Anat* 78:279.

Azzalin CM, Solomon G, Nergadze EG (2001) Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* 110:75-82.

Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA (1998) High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 7:887-94.

Bejjani BA, Shaffer LG (2008) Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:71-86.

Brambati B, Simoni G (1983) Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 1:586.

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

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

Carvalho CM, Lupski JR (2016) Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat Rev Genet* Feb 29.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49:219-222.

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-9.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, et al (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704-712.

Currall BB, Chiang C, Talkowski ME, Morton CC (2013) Mechanisms for Structural Variation in the Human Genome. *Curr Genet Med Rep* 1:81-90.

de Souza KR, Mergener R, Huber J, Campos Pellanda L, Riegel M (2015) Cytogenomic Evaluation of Subjects with Syndromic and Nonsyndromic Conotruncal Heart Defects. *Biomed Res Int* 2015:401941. Epub 2015 Jun 7.

Deak KL, Horn SR, Rehder CW (2011) The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: Variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med* 4:543-564.

DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (2009) Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. *Am J Hum Genet* 84:524-33.

- Dorfman L, Leite JC, Giugliani R, Riegel M (2014) Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *J Pediatr (Rio J)* 91:59-67.
- Dumitrescu AV, Milunsky JM, Longmuir SQ, Drack AV (2012) A family with branchio-oculo-facial syndrome with primarily ocular involvement associated with mutation of the TFAP2A gene. *Ophthalmic Genet* 33:100-6.
- Edelmann L, Hirschhorn K (2009) Clinical Utility of Array CGH for the Detection of Chromosomal Imbalances Associated with Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 1151:157-166.
- Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH (1960) A new trisomic syndrome. *Lancet* 1:787-790.
- Eichler EE (1998) Masquerading repeats: Paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res* 8: 758-762.
- Fernandes MS, Ashton-Prolla P, Matte U, Meurer L, Osvaldt A, Bittelbrunn AC, Schlatter R, Kucyk R, Silva FMP, Clausell N, Goldim JR (2010) The Hospital de Clinicas de Porto Alegre normative for the storage and use of human biological materials and their associated information in research: an interdisciplinary approach. *Revista HCPA* 30:169-79.
- Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW (2006) Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1:R57-66.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7:85-97.
- Ford CE, Hamerton JL (1956) The chromosomes of man. *Nature* 178:1020-3.
- Ford CE, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC and Briggs JH (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713.
- Genois MM, Paquet ER, Laffitte MCN, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M, Yves J (2014) Masson DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:40-73.
- Gheldof N, Witwicki RM, Migliavacca E, Leleu M, Didelot G, Harewood L, Rougemont J, Reymond A (2013) Structural variation-associated expression changes are paralleled by chromatin architecture modifications. *PLoS One* 8:e79973.
- Goidts V, Cooper DN, Armengol L, Schempp W, Conroy J, Estivill X, Nowak N, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H (2006) Complex patterns of copy number variation at sites of segmental duplications: an important category of structural variation in the human genome. *Hum Genet* 120:270-284.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307:1434-40.
- Gray YH (2000) It takes two transposons to tango transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 16:461-8.
- Grosso S, Pucci L, Di Bartolo RM, Gobbi G, Bartalini G, Anichini C (2005) Chromosome 18 aberrations and epilepsy: a review. *Am J Med Genet A* 134A:88-94.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Patho Genetics* 1:17.
- Hahnemann N (1974) Early prenatal diagnosis: A study of biopsy techniques and cell culturing from extraembryonic membranes. *Clin Genet* 6:294-306.

Hancarova M, Vejvalkova S, Trkova M, Drabova J, Dleskova A, Vlckova M, Sedlacek Z (2013) Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15. *Gene* 516:158-61.

Hastings PJ, Ira G, Lupski JR (2009) A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genet* 5: e1000327.

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

Hsu, TC (1952) Mammalian chromosomes in vitro: 1. The karyotype of man. *The Journal of Heredity* 43:167-172.

Huber J, Peres VC, de Castro AL, dos Santos TJ, da Fontoura Beltrão L, de Baumont AC, Cossio SL, Dalberto TP, Riegel M, Cañedo AD, Schaan BD, Pellanda LC (2014) Molecular screening for 22Q11.2 deletion syndrome in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 35:1356-1362.

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

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

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

Jacobs PA, Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303.

Jacobsen P, Mikkelsen M (1968) Chromosome 18 abnormalities in a family with a translocation t(18p--, 21p+). *J Ment Defic Res* 12:144-61.

Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD (2000) Structure of Chromosomal Duplicons and their Role in Mediating Human Genomic Disorders. *Genome Res* 10: 597-610.

Jones KLS (2006) Recognizable patterns of human malformation. Philadelphia: Elsevier Saunders, 6^o ed.

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

Kaufman L, Ayub M, Vincent JB (2010) The genetic basis of non- syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* 2:182-209.

Kharbanda M, Tolmie J, Joss S (2015) How to use... microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 100:24-9.

Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen MJ, van Binsbergen E, Renkens I, Duran K, Ballarati L, Vergult S, Giardino D, Hansson K et al (2012) Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. *Cell Rep* 1:648-55.

Korteweg FJ, Bouman K, Erwich JJ, Timmer A, Veeger NJ, Ravisé JM, Nijman TH, Holm JP (2008) Cytogenetic analysis after evaluation of 750 fetal deaths: proposal for diagnostic workup. *Obstet Gynecol* 111:865-74.

Laurell CB, Eriksson S (1963) The electrophoretic pattern α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 15:132-40.

- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121-128.
- Le Scouarnec S, Gribble SM (2012) Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity (Edinb)* 108:75-85.
- Lee C, Scherer SW (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* 12:e8.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235–1247.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin MR (1958) Etude des chromosomessomatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Acad Sci (Paris)* 248:1721-1722.
- Liehr T (2014) Benign & Pathological Chromosomal Imbalances. Microscopic and Submicroscopic Copy Number Variations (CNVs) in Genetics and Counseling. Elsevier, London, 232.
- Liu P, Erez A, Nagamani SC, Dhar SU, Kołodziejka KE, Dharmadhikari AV, Cooper ML, Wiszniewska J, Zhang F, Withers MA et al (2011) Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements *Cell* 146:889-903.
- Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR (2012) Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev* 22:211-20.
- Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schröck E, Ried T (1996) Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet* 14:312-315.
- Lu X, Phung MT, Shaw C, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino C, Stankiewicz P, Kang SL (2008) Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122:1310–1318.
- Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, AlChawa T, Nasser E et al (2012) Genome-wide meta-analyses of nonayndromic cleft lip with or without cleft palate identify siw new risk loci. *Nat Genet* 44:968-971.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R et al (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161:1012-25.
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangement and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-422.
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1:49.
- Lupski JR (2015) Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. *Environ Mol Mutagen* abr 17.
- Maillard M, Ruef A, Pizzagalli F, Migliavacca E, Hippolyte L, Adaszewski S, Dukart J, Ferrari C, Conus P, Männik K et al (2015) The 16p11.2 locus modulates brain structures common to autism, schizophrenia and obesity. *Mol Psychiat* 20:140-147.

- Malhotra D, Sebat J (2012) CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 16:1223-41.
- Maluf SW, Riegel M, et al. (2011) *Citogenética Humana*. Ed. Artmed, Porto Alegre.
- Mani RS, Chinnaiyan AM (2010) Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* 11:819-29.
- Marangi G, Ricciardi S, Orteschi D, Lattante S, Murdolo M, Dallapiccola B, Biscione C, Lecce R, Chiurazzi P, Romano C (2011) The Pitt-Hopkins syndrome: report of 16 new patients and clinical diagnostic criteria. *Am J Med Genet A* 155A:1536-45.
- Marical H1, Le Bris MJ, Douet-Guilbert N, Parent P, Descourt JP, Morel F, De Braekeleer M (2007) 18p trisomy: a case of direct 18p duplication characterized by molecular cytogenetic analysis. *Am J Med Genet A* 143A:2192-5.
- McVey M, Lee SE (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 24:529-38.
- Meshcheryakova TI, Zinchenko RA, Vasilyeva TA, Marakhonov AV, Zhylina SS, Petrova NV, Kozhanova TV, Belenikin MS, Petrin AN, Mutovin GR (2015) A clinical and molecular analysis of branchio-oculo-facial syndrome patients in Russia revealed new mutations in TFAP2A. *Ann Hum Genet* 79:148-52.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749-64.
- Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK (2011) 1000 Genomes Project. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470:59-65.
- Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, Burch MN, Clemens M, Mulliken JB, Smith R, Lin AE (2008) TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 82:1171-7.
- Milunsky JM, Maher TM, Zhao G, Wang Z, Mulliken JB, Chitayat D, Clemens M, Stalker HJ, Bauer M, Burch M et al (2011) Genotype-phenotype analysis of the branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med Genet A* 155A:22-32.
- Misteli T (2007) Beyond the Sequence: Cellular Organization of Genome Function. *Cell* 128: 787–800.
- Moore G, Shaw P (2009) Improving the chances of finding the right partner. *Curr Opin Genet Dev* 19:99–104.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, BattipsDM, Hungerford DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes 206 Human molecular cytogenetics cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616.
- Moustacchi E (2000) DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 3:464:35-40.
- Nelson K, Holmes L (1989) Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. *N Engl J Med* 20:19-23.
- Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MÁ, Santos F, García-Miñaur S, García-Santiago F, Mansilla E, Fernández L, de Torres ML, Riegel M, Lapunzina P (2014) New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol* 37 (1 Suppl): 210-9.

- Newman S, Hermetz KE, Weckselblatt B, Rudd MK (2015) Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. *Am J Hum Genet* 96:208-20.
- Niazi M, Coleman DV, Loeffler FE (1981) Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi. *Br J Obstet Gynaecol* 88:1081-1085.
- Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20:462-466.
- Orendi K, Uhrig S, Mach M, Tschepper P, Speicher MR (2013) Complete and pure trisomy 18p due to a complex chromosomal rearrangement in a male adult with mild intellectual disability. *Am J Med Genet A* 161A:1806-12.
- Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, L'Heureux J, Pfundt R, Staaf J, van der Vliet WA et al (2008) Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 45:81-6.
- Ou Z, Stankiewicz P, Xia Z, Breman AM, Dawson B, Wiszniewska J, Szafranski P, Cooper L, Rao M, Shao L, et al (2011) Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes. *Genome Res* 21:33-46.
- Painter TS (1923) Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool* 37:291-321.
- Palumbo O, Palumbo P, Palladino T, Stallone R, Miroballo M, Piemontese MR, Zelante L, Carella M (2012) An emerging phenotype of interstitial 15q25.2 microdeletions: clinical report and review. *Am J Med Genet A* 158A:3182-9.
- Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP (1960) Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1:790-793.
- Peippo M, Ignatius J (2012) Pitt-Hopkins Syndrome. *Mol Syndromol* 2:171-180.
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J and van Dekken H (1986) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:151-157.
- Pinkel D, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo W-L, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet* 20:207-211.
- Pitt D, Hopkins I (1978) A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. *Aust Paediatr J* 14:182-4.
- Pratto F, Brick K, Khil P, Smagulova F, Petukhova GV, Camerini-Otero RD (2014) DNA recombination. Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science* 344:346.
- Rautenstraub BW, Liehr T (2002) *FISH Technology*. Springer Verlag: Berlin.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-54.
- Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, Bustamante CD, Evans JP, Landrum MJ, Ledbetter DH, Maglott DR, Martin CL, Nussbaum RL, Plon SE, Ramos EM, Sherry ST, Watson MS (2015) ClinGen--the Clinical Genome Resource. *ClinGen. N Engl J Med* 372(23):2235-42.

- Ricard G, Molina J, Chrast J, Gu W, Gheldof N, Pradervand S, Schütz F, Young JI, Lupski JR, Reymond A, Walz K (2010) Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models. *PLoS Biol* 8(11):e1000543.
- Riegel M (2014) Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet Mol Biol* 37(1 Suppl):194-209
- Riegel M, Barcellos N, Mergener R, de Souza KRS, Leite JCL, Kessler R, Moreira LMA, Giugliani R (2015) Molecular cytogenetic evaluation of chromosomal microdeletions: the experience of a public hospital in southern Brazil. *Clin Biomed Res* 34:357-365.
- Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM, Wain KE, Williams ES, Aradhya S, Kearney HM, et al (2012) Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet* 81:403-12.
- Riggs ER, Ledbetter DH, Martin CL (2014) Genomic Variation: Lessons Learned from Whole-Genome CNV Analysis. *Curr Genet Med Rep* 2:146-150.
- Rosenfeld JA1, Leppig K, Ballif BC, Thiese H, Erdie-Lalena C, Bawle E, Sastry S, Spence JE, Bandholz A, Surti U et al (2009) Genotype-phenotype analysis of TCF4 mutations causing Pitt-Hopkins syndrome shows increased seizure activity with missense mutations. *Genet Med* 11:797-805.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24-6.
- Sahoo T, Wang JC, Elnaggar MM, Lara PS, Ross LP, Mahon LW, Hafezi K, Deming A, Hinman L, Bruno Y, Bartley JA, Liehr T, Anguiano A, Jones M (2015) Concurrent triplication and uniparental isodisomy: evidence for microhomology-mediated break-induced replication model for genomic rearrangements. *European Journal of Human Genetics* 23:61–66.
- Sasaki M, Lange J, Keeney S (2010) Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:182–195.
- Schinzel A (2001) *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*. 2nd edition. Walter de Gruyter Press, Berlin, pp. 966.
- Seabright M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316:445-9.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-8.
- Shaffer LG, Beijani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC (2007) The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Genet C Semin Med Genet* 145C:335-345.
- Shaffer LG, Lupski JR (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34:297-329.
- Sharp AJ (2009) Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat* 30:135-44.

Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC et al (2006) Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 38:1038-42.

Shaw CJ, Lupski JR (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R57-64.

Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC (2009) Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85:42-51.

Sibbons C, Morris JK, Crolla JA, Jacobs PA, Thomas NS (2012) De novo deletions and duplications detected by array CGH: a study of parental origin in relation to mechanisms of formation and size of imbalance. *Eur J Hum Genet* 20:155-60.

Simmons AD, Carvalho CM, Lupski JR (2012) What have studies of genomic disorders taught us about our genome? *Methods Mol Biol* 838:1-27.

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

South TS (2011) Chromosomal Structural Rearrangements: Detection and Elucidation of Mechanisms Using Cytogenomic Technologies. *Clin Lab Med* 31:513-24,

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

Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18:74-82.

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

Steele MW, Breg Jr WR (1966) Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet* 1:383-385.

Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, Alkan C, Malig M, Tsalenko A, Sampas N, Bruhn L, Shendure J, 1000 Genomes Project, Eichler EE (2010) Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 330:641-6.

Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:739-750.

Thevenon J, Callier P, Poquet H, Bache I, Menten B, Malan V, Cavaliere ML, Girod JP, Thauvin-Robinet C, El Chehadeh S et al (2013) 3q27.3 microdeletional syndrome: a recognisable clinical entity associating dysmorphic features, marfanoid habitus, intellectual disability and psychosis with mood disorder. *J Med Genet* 51:21-7.

Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, Jacobs P (2006a) Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119:444-50.

Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, Dennis NR, Jacobs PA (2006b) Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet* 14:831-7.

Tjio JH, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hered* 42:1-6.

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

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

University California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser, 2002 [cited 2016 Feb 03] Available from: <http://genome.ucsc.edu/>

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

Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ (2012) Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat* 33:906-15.

Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, de Moor B et al (2005) Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 53:413-22.

Vianna GS, Medeiros PF, Alves AF, Silva TO, Jehee FS (2016) Array-CGH analysis in patients with intellectual disability and/or congenital malformations in Brazil. *Genet Mol Res* 19:15.

Visser LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D et al (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic Chromosomal Abnormalities. *Am J Hum Genet* 73:1261–1270.

Visser LE, Stankiewicz P (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol* 838:29-75.

Volpi EV, Bridger JM (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* 45:385-6.

Weischenfeldt JI, Symmons O, Spitz F, Korbel JO (2013) Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet*. 14:125-38.

Williams GJ1, Lees-Miller SP, Tainer JÁ (2010) Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 9:1299-306.

Wells RD (2007) Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci* 32(6):271-8.

World Health Organization. Report 2014. <http://www.who.int/>.

Yunis JJ (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268-1270.

Zeesman S, Kjaergaard S, Hove HD, Kirchhoff M, Stevens JM, Nowaczyk MJ (2012) Microdeletion in distal 17p13.1: a recognizable phenotype with microcephaly, distinctive facial features, and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 158A:1832-6.

Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR (2009) Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25:298-307.

Zhang F, Potocki L, Sampson JB, Liu P, Sanchez-Valle A, Robbins-Furman P, Navarro AD, Wheeler PG, Spence JE, Brasington CK, Withers MA, Lupski JR (2010) Identification of uncommon recurrent Potocki-Lupski syndrome-associated duplications and the distribution of rearrangement types and mechanisms in PTLs. *Am J Hum Genet* 86:462-70.

Avaliações anteriores

- **Citogenética**

SIM NÃO

Se SIM, descrever o resultado: _____

- **Exame genético laboratorial**

SIM NÃO

Se SIM, descrever o resultado: _____

ANTECEDENTES

3) Antecedentes Materno-obstétricos

- **Doenças maternas antes da gravidez?**

SIM NÃO

Se SIM, descrever quais: _____

- **Há antecedentes de aborto?**

SIM NÃO

Se SIM, marcar as opções: Espontâneo Provocado

- **Idade da mãe na época do aborto:**

Menos de 20 anos Entre 20 e 30 anos Entre 30 e 40 anos Mais de 40 anos

- **Informar o nº e idade gestacional dos abortos:**

4) Gestação do caso em Investigação

- **Idade mãe:**

Menos de 20 anos Entre 30 e 40 anos

Entre 20 e 30 anos Mais de 40 anos

- **Duração da gestação (informar em meses):**

- **Fez Pré-Natal?**

SIM NÃO

Se SIM, marcar as opções: Rede Pública Particular

- **Mês do início dos movimentos fetais (informar qual mês):** _____

- **Notou diferenças em relação as outras gestações?**

SIM NÃO

Se SIM, quais: _____

- **Exposição à teratógenos durante a gestação** (exemplos: radiação, álcool, drogas, fumo, Citotec, medicamentos, outros)?

SIM NÃO

Se SIM, responder as opções abaixo:

Período de exposição: _____

Citar quais: _____

Tempo de uso: _____

- **Anormalidade detectada em ecografia?**

SIM NÃO

Se SIM, quais: _____

- **Outras intercorrências?**

SIM NÃO

Se SIM, quais: _____

5) Informações Perinatais

- **Tipo de parto:**

Vaginal Fórceps Cesárea

Indicação: _____

Local: _____

Assist.: _____

Apresentação: _____

Trabalho de parto / incorrências: _____

Peso ao nascer: _____

Estatura: _____

PC: _____ PT: _____

Apgar:

1º m _____ 5º m _____

Teve alta com quantos dias? _____

- **Ventilação mecânica:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **RN na Incubadora:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **Berçário:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **Infeções/febre:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **CTI neo natal:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **Convulsões neonatais:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **Icterícia:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o tempo: _____

- **Cianose:**

SIM NÃO

- **Choro:**

Rápido

Demorado

Miado de gato

- **Tratamento:**

Tratada em casa Fototerapia

Ex-sang. Transfusão

- **Alteração Suor/ Urina:**

SIM NÃO

Descrever: _____

6) Recém-nascido

- **Exame do pezinho:**

SIM NÃO normal alterado

Qual? _____

7) Desenvolvimento Neuropsicomotor

- **Sustentar cabeça:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o mês: _____

- **Em pé com apoio:**

SIM NÃO

Se SIM, informar o mês: _____

- **Rolar:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Sentar COM apoio:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Sentar SEM apoio:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Arrastar-se:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Controle esfíncteres:**
SIM NÃO Diurno Noturno
- **Aparecimento do 1º dente:**
NÃO sabe NÃO 5-7mês 8-12 mês 13-18 mês 19-24 mês após 2 anos
- **Fechamento da fontanela anterior:**
NÃO sabe NÃO 9-17 mês 18-24 mês após 2 anos
- **Em pé sem apoio:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Deambular com apoio:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Deambular:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____
- **Fala:**
SIM NÃO
Se SIM, informar o mês: _____

8) Antecedentes Familiares

- **Avós paternos vivos:**
SIM NÃO
- **Avós maternos vivos:**
SIM NÃO
- **Irmãos vivos:**
SIM NÃO Se SIM, informar:
 - Irmão 1 • _____ • Antecedentes progressos
Sexo: M F Idade: _____
Escolaridade (se houver): _____
 - Irmão 2 • _____ • Antecedentes progressos
Sexo: M F Idade: _____
Escolaridade (se houver): _____
 - Irmão 3 • _____ • Antecedentes progressos
Sexo: M F Idade: _____
Escolaridade (se houver): _____
- **Ant. pais (consanguinidade e patologias progressas)**
SIM NÃO
Se SIM, informar quais: _____

- **Mais irmãos? Descrever as mesmas características acima nas linhas abaixo:**

• **Irmãos falecidos:**
 SIM NÃO

Se SIM, informar:

<p>Irmão 1 •</p> <p>Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/></p> <p>Idade: _____</p> <p>Causa Mortis: _____</p>	<p>Irmão 2 •</p> <p>Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/></p> <p>Idade: _____</p> <p>Causa Mortis: _____</p>
--	--

• **Outras doenças na família?**
 SIM NÃO

Se SIM, quais: _____

9) Exame Físico

• Idade: _____ • Peso: _____ • Estatura: _____ • Perímetro cefálico: _____

Descrever os exames realizados:

HISTÓRIA CLÍNICA

Descrever, em linhas gerais, o acompanhamento clínico do paciente: _____

HEREDOGRAMA

Se houver outros afetados na família.

ANEXO II – Termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas.



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

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

Titulo do Projeto

**INVESTIGAÇÃO CITOGENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS
ESTRUTURAIS ASSOCIADOS A MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS MÚLTIPLAS**

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

Porto Alegre, 30 de outubro de 2014

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Rafaella Mergener	
Mariluce Riegel	

GLOSSÁRIO

BIR – Replicação induzida por quebra (*Break-induced replication*) – Reparação de uma forquilha de replicação quebrada, a cadeia invasora copia todo o braço distal do cromossomo homólogo, usado como molde, resultando em LOH. BIR parece ser, pelo menos, um dos mecanismos responsáveis pelo alongamento alternativo dos telômeros.

Conformação não B da estrutura do DNA – O termo se refere a qualquer conformação de DNA que não é o a dupla hélice ortodoxa descrita por Watson e Crick. Considerando que um cromossomo, provavelmente, consiste de uma única molécula de DNA em cadeia dupla, os segmentos helicoidais individuais podem existir em conformações diferentes, devido à flexibilidade e plasticidade da molécula.

DSBR – Reparo de quebra de fita dupla (*Double-strand break repair*) – Mecanismo de reparo onde ambas extremidades quebradas invadem um modelo homólogo para restaurar a sequência original.

FoSTeS – Colapso de forquilha com desvio do modelo (*Fork Stalling and Template Switching*) – Deslize da fita descontínua durante a replicação do DNA, devido a uma lesão que, em virtude de microhomologia, liga-se em outra forquilha de replicação fisicamente próxima e reinicia a síntese. A cadeia nascente pode desengatar novamente após um curto período de tempo e migrar para outra forquilha ou voltar para sua própria.

HJs – Junções de Holliday (*Holliday Junction*) – Estrutura em forma de cruz que se forma como um intermediário no processo de recombinação genética a fim de os segmentos trocar informação genética.

Hotspots – locais de atividade de recombinação elevada, têm tipicamente 1-2 kb de comprimento e estão rodeados por regiões que são essencialmente desprovidos de recombinação. Ou seja, *hotspots* definem os padrões de herança genômicos em cada geração.

HRR – Reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination Repair*) – Sistema de reparo que prepara a síntese de DNA ao invadir um modelo homólogo para restaurar com precisão a sequência danificada. As sequências homólogas podem ser adquiridas da cromátide irmã (após a replicação do DNA), um cromossomo homólogo ou uma sequência duplicada no mesmo ou em um cromossomo diferente. HRR é essencial para manter a fidelidade na segregação cromossômica meiótica.

ITs – Telômeros intersticiais (*interstitial telomeres*) – Localização de intrachromosomal de sequências teloméricas (T2AG3)_n, provavelmente originados através de fusão telomérica dos cromossomos ancestrais.

LCR – Baixo número de cópias (*low copy repeats*) – Também chamado de “duplicações segmentares” ou *duplicons*, são blocos de DNA específicos em uma região, geralmente de 10 a 300 kilobases (kb) de tamanho e de > 95% a 97% de homologia um com o outro.

MEPS – Segmentos mínimos de processamento (*Minimal efficient processing segments*) – identidade mínima necessária para haver pareamento entre duas LCRs.

Minissatélite – Região de DNA na qual unidades de 10-50 pb são repetidas em tandem e dispostas em matrizes de 0,5-30 kb de comprimento.

MMBIR – Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (*Microhomology-mediated break-induced replication*) – Semelhante a BIR por ser um mecanismo de reparo de uma forquilha de replicação quebrada com invasão para obter o molde, entretanto, por necessitar de micro-homologia pode deslizar por outras cadeias como ocorre em FoSTes.

MMEJ – União das extremidades mediada por microhomologia (*Microhomology-mediated end joining*) – Similar a SSA, entretanto é mediada por emparelhamento de sequências homólogas pequenas (~5-25 nts). Resulta em deleções e é freqüentemente associada com translocações cromossômicas.

NAHR – Recombinação homóloga não alélica (*Nonallelic homologous recombination*) – Conhecida também como “recombinação ectópica”, refere-se à recombinação entre segmentos não-alélicos de DNA que compartilham elevada semelhança de sequências.

NHEJ – União de extremidades não homólogas (*Non-homologous end-joining*) – Mecanismo de reparo de quebras de fita dupla de DNA que não exige homologia. Resulta em deleções ou inserções na região envolvida.

Parálogo – Dois segmentos genômicos não alélicos, que variam entre 10 kb e 300 kb de tamanho e possuem sequências de DNA altamente semelhantes, que são derivados a partir de um evento de duplicação.

Pericentromérico – Refere-se a uma zona de transição grande que começa imediatamente distal em relação a repetição α -satélite estendendo-se até a primeira banda citogenética distinguível coradas com Giemsa em ambos os lados do centrômero.

Recombinações V(D)J – Recombinação (por NHEJ) necessária para formação da diversidade no receptor de antígeno de células B, sob a forma de imunoglobulinas ou em células T na forma de receptores de células T.

SDSA – Ligação dependente da síntese da cadeia de DNA (*Synthesis-dependent strand annealing*) – Semelhante ao modelo DSBR nos passos iniciais de invasão em um cromossomo homólogo, mas em vez de capturar a segunda extremidade da DSB na recombinação intermediária, a cadeia invasora é deslocada após síntese de reparação e se liga com a cauda de cadeia simples na outra extremidade da DSB.

SPO11 – *Sporulation-specific protein 11* – Proteína responsável por criar quebras de fita dupla no início da prófase I na meiose I iniciando assim o processo de recombinação, também conhecido como *crossing-over*.

SRO – *Smallest region of overlap*, Local mínimo partilhado entre os rearranjos não recorrentes, que engloba o gene associado com a doença transmitida.

SRS – Derrapagem em série da replicação (*Serial Replication Slippage*) – Variação do modelo FoSTes, que assume que a derrapagem na replicação ocorre em sites adjacentes (possivelmente dentro de uma mesma forquilha de replicação).

SSA – Emparelhamento de fita simples (*Single-strand annealing*) – Via de reparo de quebras de fita dupla que acontece por emparelhamento de sequências homólogas longas (> 30 nts), Resulta em deleções.