

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

TATIANA MOZER JOAQUIM

**CORRELAÇÃO CARIÓTIPO-GENÓTIPO-FENÓTIPO DE
REARRANJO CROMOSSÔMICO ESTRUTURAL FAMILIAR
ENVOLVENDO AS REGIÕES 4p E 12q**

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2016**

TATIANA MOZER JOAQUIM

**CORRELAÇÃO CARIÓTIPO-GENÓTIPO-FENÓTIPO DE
REARRANJO CROMOSSÔMICO ESTRUTURAL FAMILIAR
ENVOLVENDO AS REGIÕES 4p E 12q**

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Joaquim, Tatiana Mozer

Correlação cariótipo-genótipo-fenótipo de rearranjo cromossômico estrutural familiar envolvendo as regiões 4p e 12q. Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

135p: il;30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lucia

1. Citogenética; 2. Translocação cromossômica; 3. Derivativo de 4; 4. FISH; 5. Citogenômica; 6. *array*-CGH

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Tatiana Mozer Joaquim

Título: **Correlação cariótipo-genótipo-fenótipo de rearranjo cromossômico estrutural familiar envolvendo as regiões 4p e 12q**

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Aprovada em: _____|_____|_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais,

Robinson Roberto Joaquim e Marlene Mozer Joaquim,

e à Lucimar Aparecida Fernandes Laureano,

Sílvio Avelino dos Santos e

Maria Eliane Longhi Barroso

“Fiozinhos do cabelo de Deus que caíram sobre a minha vida”

(João Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, em especial à:

Deus e a NS^a Aparecida por me mostrarem sempre o melhor caminho e por colocarem pessoas tão especiais na minha vida.

À **Profa. Dra. Lucia Regina Martelli** pela generosidade com que me abriu as portas do mundo acadêmico, pelo carinho, incentivo, apoio constante e orientação dedicada. Por me ensinar a ser mais do que citogeneticista humana, uma pessoa melhor. Por acreditar e confiar em mim durante todas as etapas desse trabalho. Muito obrigada por encarar comigo este desafio.

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela estrutura oferecida e aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Pesquisa (**CNPq**) e Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do HCFMRP (**FAEPA**) pelo auxílio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire** por todas as contribuições para o desenvolvimento desse trabalho, pela convivência harmoniosa, pelas discussões e por todo apoio dedicado ao meu crescimento científico e pessoal.

Ao **Silvio Avelino dos Santos** pelo carinho com que me estendeu a mão desde o primeiro dia em que nos vimos, por partilhar comigo suas histórias e conhecimentos em Citogenética.

À **Lucimar Aparecida Fernandes Laureano** por todo ensinamento a mim transmitido, pelo carinho, amizade, paciência e conselhos sempre valiosos. Por manter vivo o meu amor pelos cromossomos e, sobretudo, por reacender em mim a Fé, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao **Dr. Carlos Henrique Paiva Grangeiro** pela dedicação e disponibilidade com que sempre atendeu os pacientes incluídos neste trabalho, por compartilhar comigo um pouco dos seus conhecimentos em Genética Médica, pelo companheirismo e amizade sincera.

Aos amigos de laboratório e grandes companheiros de trabalho **Clarissa Picanço, Juliana Josahkian, Livia Ferreira, Thiago Vidotto e Juliana Dourado** por estarem sempre presentes, nos bons e nos maus momentos, por me proporcionarem tantos sorrisos e por enxugarem minhas lágrimas quando não pude evitar que elas caíssem. Em especial a **Alexandra Galvão Gomes** e a **Flávia Gaona de Oliveira Gennaro** por além de tudo isso, dividirem comigo a bancada durante os experimentos e por todo auxílio com a análise dos dados. Muito Obrigada por me presentear com a amizade, e tornarem meus dias mais leves e divertidos.

A todos que fizeram e fazem parte da “Família Bloco C”, **Profª. Dra. Ester Silveira Ramos, Cristiana Libardi, Heloise Luchiari, Matheus Eiras, Murilo Soares, Grace Ruiz Lara, Carolina Verruma, Marco Aurélio Prata, Manuela Gama, Thatiane Malta, Thais Sabedot, Reginaldo Vila, Marli Galerani, Luiz Bezerra, Sebastião Paulo, Mara Aparecida e Tânia Mara Gimenez**, pelo apoio, incentivo e convivência harmoniosa.

À equipe de citogeneticistas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Sarah Melo Padilha, Rinaldo Madona Scarparo, Lucimar Aparecida Fernandes Laureano, Sonia Scandiussi e Aide Barbosa dos Santos** por serem sempre tão pacientes e carinhosos comigo, pelos momentos inesquecíveis de convívio, por me ensinarem tanto e por tornarem esse trabalho possível.

Aos **docentes, médicos assistentes, residentes e funcionários** do setor de Genética Médica, por todas as contribuições para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial à **Maria Lucia Castro, Natália Renault, Carlos Magno Leprevost, Ana Cristina Gomes**

Silva, Sue Ellen Pontes, Maria Paola Torres Nieto, Thereza Loureiro, Rayana Elias Maia e Fátima das Graças Carvalho pelos bons momentos de convívio e amizade.

Ao **Laboratório de Hematologia** e ao **Laboratório de Oncologia Pediátrica** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto onde realizei parte dos experimentos que compõem o trabalho. Em especial ao **Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci** e ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone** por permitirem o uso dos equipamentos, e às biólogas **Amélia Araújo** e **Rosane Queiroz**, por todo auxílio durante a execução das técnicas.

À **Karina Bezerra Salomão** e **Lara Elis Alberici** por toda ajuda com a parte de biologia molecular do trabalho, desde as PCRs à discussão dos resultados e por me proporcionarem tantas risadas. Mais do que especialmente, agradeço à Karina pelo carinho sincero, amizade verdadeira e por todo esforço em não permitir que eu desanimasse diante das dificuldades.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP USP e aos que conquistei ao longo da vida, sobretudo à **Sarah Blima, Larissa Oliveira Guimarães, Ana Carolina Coelho, Simone Carvalho, Maria Eduarda Morgana, Ildercílio Lima, Agnes Magri, Josiane Scarpassa, Marcela Tsuboy** e **Paulo Vitor Soares** pelos conselhos, discussões científicas e por todo incentivo desde quando eu era apenas uma estagiária entusiasmada e à **Susie Adriana Penha Nalon** por toda atenção, disponibilidade e apoio prestado.

Ao **Prof. Dr. Wagner José Martins Paiva** por acreditar no meu potencial, proporcionar minha iniciação na carreira científica e por todo auxílio para que eu chegasse até aqui.

À **Maria Eliane Longhi Barroso** por tão carinhosamente plantar em mim a “sementinha” da Citogenética e me apresentar o mundo dos “cromossomos felizes” e à **Daniele Sartori e Isabele Kazahaya** por sempre me incentivarem a buscar novos horizontes, por mais difícil que isso possa parecer.

Aos membros da **banca examinadora** por todas as contribuições para a melhoria deste trabalho.

Às **pacientes** e seus **familiares** que aceitaram a participar da pesquisa. Obrigada por toda confiança em nós depositada.

À minha **família**, o meu maior presente, por me apresentarem o que há de bom no mundo, me proporcionarem tantos momentos felizes e me ensinarem que o mais simples é sempre o mais importante.

Aos meus pais, **Robinson Roberto Joaquim e Marlene Mozer Joaquim**, meus exemplos de vida e maiores incentivadores, pelo apoio constante e amor incondicional. Muito Obrigada por nunca permitirem que eu desistisse dos meus sonhos.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

*“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um
único dia em sua vida.”*

(Confúcio)

RESUMO

JOAQUIM, T. M. **Correlação cariótipo-genótipo-fenótipo de rearranjo cromossômico estrutural familiar envolvendo as regiões 4p e 12q.** 2016, 135p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Rearranjos cromossômicos estruturais estão potencialmente associados ao desenvolvimento de doenças genéticas devido à disrupção, inativação ou alteração da dosagem gênica. O objetivo deste projeto foi realizar a caracterização genômica de duas pacientes e seus familiares portadores de rearranjo cromossômico estrutural envolvendo o braço curto do cromossomo 4 e o braço longo do cromossomo 12, associando técnicas de citogenética clássica (bandamento GTG), citogenética molecular (FISH) e citogenômica (*array*-CGH), para definição diagnóstica e maior conhecimento sobre os fatores envolvidos na correlação cariótipo-genótipo-fenótipo. Foram avaliados seis indivíduos, duas pacientes, primas em primeiro grau que apresentavam alterações fenotípicas, assim como seus familiares, portadores de translocação aparentemente equilibrada e fenótipo normal. Apesar das duas pacientes apresentarem alteração cromossômica comum, derivativo do cromossomo 4 [der(4)], foram observados achados fenotípicos distintos. A investigação permitiu a definição do diagnóstico de deleção 4p16 e trissomia 12qter para as duas pacientes com fenótipo alterado e cariótipo 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.3), a definição precisa dos pontos de quebra em 4p16.3 e 12q24.31→q24.33, assim como a determinação da origem parental do rearranjo e a definição do diagnóstico citogenético final de quatro portadores de translocação aparentemente equilibrada e cariótipo t(4;12)(4pter→4p16.3::2q24.31→12qter;12qter→12q24.31::4p16.3→4pter), direcionando o aconselhamento genético para a família. Nas duas pacientes, a técnica de *array*-CGH (Plataforma 2x400K, Agilent®) detectou uma diferença sutil de tamanho entre as perdas e ganhos referentes aos cromossomos envolvidos no rearranjo, sendo diagnosticado em P1 uma perda de 2.707.221 pb na citobanda 4p16.3, além de um ganho de 12.405.205 pb em 12q24.31→q24.33. A paciente 2 apresentou uma perda de 2.710.969 pb em 4p16.3 e um ganho de 12.393.885 pb em 12q24.31→q24.33. Ambas as regiões de desequilíbrio genômico incluem genes que podem ser relevantes para manifestação fenotípica observada nas pacientes, entre eles: *WHSC1*, *NELFA*, *LETM1*, *FGFRL1* e *SPON2*. Os resultados da investigação citogenômica indicaram, ainda, a presença de translocação equilibrada nos quatro indivíduos portadores, não sendo detectadas perdas e/ou ganhos genômicos nas regiões dos pontos de quebra cromossômica. Os resultados obtidos na investigação do padrão de metilação dos genes *FGFRL1* e *SPON2* não permitiram afirmar que uma provável repressão da expressão gênica devido ao *imprinting* materno e paterno esteja associada às características fenotípicas distintas observadas nas duas pacientes. Embora tenha sido possível a indicação de genes correlacionados ao fenótipo das pacientes, a correlação entre a alteração genética e o fenótipo das mesmas pode depender da ação sinérgica dos mais de 190 genes envolvidos neste rearranjo cromossômico estrutural familiar.

Palavras-chave: Citogenética; Translocação cromossômica; Derivativo de 4; FISH; Citogenômica; *array*-CGH.

ABSTRACT

JOAQUIM, T. M. **Karyotype-genotype-phenotype correlation of a familial structural chromosomal rearrangement involving regions 4p and 12q.** 2016, 135p. Master's degree in Science - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Structural chromosomal rearrangements are potentially associated with the development of genetic disorders due to disruption, inactivation or gene dosage alterations. The objective of this project was to perform the genomic characterization of a familial structural chromosomal rearrangement involving the short arm of chromosome 4 and the long arm of chromosome 12 in two patients and carriers. The experimental approach involved using a combination of classical cytogenetic techniques (GTG banding), molecular cytogenetics (FISH) and cytogenomics (array-CGH), to provide a diagnostic definition and a better understanding of how changes in the karyotype and genotype may be associated with the phenotype. Six individuals were evaluated, two patients with phenotypic abnormalities, as well as the carriers of an apparently balanced 4p;12q translocation with normal phenotypes. Although the two patients showed a common chromosomal abnormality, the derivative chromosome 4 [der(4)], they presented distinct phenotypic findings. The investigation provided a definition of the diagnosis of 4p16 deletion and trisomy 12qter for the two patients with abnormal phenotypes and a karyotype 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.3). In addition a precise definition of the breakpoints at 4p16.3 and 12q24.31→q24.33, and the parental origin of the rearrangement was determined. A precise definition of the cytogenetic diagnosis of four carriers with an apparently balanced translocation and karyotype t(4;12)(4pter→4p16.3::2q24.31→12qter; 12qter 12q24.31→4pter::4p16.3), facilitated the genetic counseling for the family. In both patients, the array-CGH technique (2x400K Platform, Agilent®) detected a subtle difference in size between losses and gains in the chromosomal regions involved in the rearrangement. Patient 1 presented a loss of 2,707,221 bp in the cytoband 4p16.3, and a gain of 12,405,205 bp in 12q24.31→q24.33. Patient 2 had a loss of 2,710,969 bp in 4p16.3 and a gain of 12,393,885 bp in 12q24.31 → q24.33. Both regions of genomic imbalance included genes that may be relevant to phenotypic findings observed in our patients, including: *WHSC1*, *NELFA*, *LETM1*, *FGFRL1* and *SPON2*. Genomic findings also confirmed the presence of a balanced translocation in four carriers, with no genomic losses and/or gains in the regions of chromosome breakpoints. The results of the investigation of the methylation pattern of *FGFRL1* and *SPON2* genes could not demonstrate that repression of gene expression due to maternal and paternal imprinting was associated with the distinct phenotypes observed in the two patients. Although it has been possible to indicate genes related to the phenotype of the patients, the correlation between the genetic alteration and phenotype may depend on the synergistic action of multiple genes from more than the 190 involved in this familial chromosomal rearrangement.

Keywords: Cytogenetics; Chromosomal translocation; Chromosome 4 Derivative ; Balanced Rearrangement; FISH; Cytogenomics; array-CGH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consequências dos rearranjos cromossômicos..	23
Figura 2: Esquema da segregação meiótica em portadores de translocação recíproca..	25
Figura 3: Ilustra a técnica de <i>array</i> -CGH..	33
Figura 4: Heredograma da família estudada.....	43
Figura 5: Quadro comparativo mostrando algumas das dismorfias observadas nas pacientes 1 e 2.	46
Figura 6: Esquema das etapas seguidas para enriquecimento das 5-metilcitosinas	56
Figura 7: Imagem dos cromossomos envolvidos no rearranjo após aplicação da técnica de bandamento GTG e seus respectivos ideogramas..	60
Figura 8: Cariótipo por bandamento GTG da paciente 1 (P1)	61
Figura 9: Cariótipo por bandamento GTG da paciente 2 (P2)	62
Figura 10: Cariótipo por bandamento GTG de um dos portadores de translocação aparentemente equilibrada.....	62
Figura 11: Célula metafásica das pacientes com fenótipo alterado, após aplicação da técnica de FISH.....	64
Figura 12: Célula metafásica e núcleo interfásico de um portador da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada, após a aplicação da técnica de FISH.	65
Figura 13: Imagem comparativa mostrando as perdas e ganhos genômicos observados nos cromossomos envolvidos no rearranjo cromossômico.....	70
Figura 14: Gráfico comparativo que resume as perdas e ganhos genômicos detectados nos cromossomos 4 e 12 de todos os indivíduos avaliados pela técnica de <i>array</i> -CGH.....	72
Figura 15: Esquema demonstrando os cromossomos envolvidos no rearranjo estrutural (pares 4 e 12) e seus respectivos ideogramas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espectro fenotípico observado nas pacientes 1 e 2.....	44
Tabela 2: Eficiências dos <i>primers</i> utilizados para análise de metilação dos genes <i>FGFRL1</i> e <i>SPON2</i>	55
Tabela 3: Diagnóstico citogenético das pacientes P1 e P2 e dos portadores da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada de origem familiar.	63
Tabela 4: Diagnóstico citogenético molecular por FISH das pacientes P1 e P2 e dos portadores da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada.	66
Tabela 5: Mostra alterações genômicas ocorridas nos cromossomos envolvidos no rearranjo cromossômico não equilibrado das pacientes 1 e 2 (P1 e P2) diagnosticadas pela técnica de <i>array</i> -CGH.	68
Tabela 6: Diagnóstico citogenético definitivo dos indivíduos analisados, após aplicação das técnicas de bandamento GTG e <i>array</i> -CGH.	73
Tabela 7: Estudo da metilação do gene <i>FGFRL1</i>	75
Tabela 8: Sinais clínicos avaliados nas pacientes descritas nesse estudo em comparação com os dados da literatura	86

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>array</i> -CGH	Hibridação Genômica Comparativa em microarranjos
BAC	Cromossomo Artificial de Bactéria
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CNV	Variação no Número de Cópias
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Citosina Fosfato Guanina
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DGV	Banco de Dados das Variantes Genômicas
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DNMT	Enzima DNA Metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FASST2	<i>Fast Adaptive States Segmentation Technique</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo
GEN3	Ambulatório de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GTG	Giensa Tripsina Giensa
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
ISCA	Consórcio Internacional de <i>array</i> Genômico
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana
KCl	Cloreto de Potássio
LCR	Repetição de Poucas Cópias
m-FISH	multicolor FISH
5mC	5-metilcitosina
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in man</i>
P1	Paciente 1
P2	Paciente 2
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pH	Potencial de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Solução nutritiva para cultivo celular
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SD	Síndrome de Down
SKY	Cariótipo Espectral
SNP- <i>array</i>	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSC	Solução Salina Citrato
SWH	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TM	Temperatura de <i>Melting</i>
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
chr	Cromossomo
der	Cromossomo derivativo
g	Força Gravitacional
h	Hora
ins	Inserção cromossômica
inv	Inversão cromossômica
Kb	Kilobase
KHz	Quilohertz
mat	Rearranjo cromossômico de origem materna
Mb	Megabase
mL	Mililitro
p	Braço curto do cromossomo
pat	Rearranjo cromossômico de origem paterna
pb	Par de base
q	Braço longo do cromossomo
rpm	Rotações por Minuto
t	Translocação
ter	Região terminal dos braços cromossômicos
W	Watts
µg	Micrograma
µL	Microlitro
pmol/µL	Picomol por microlitro
%	Porcentagem
®	Marca registrada

SUMÁRIO

Introdução.....	20
I.1 Citogenética Clínica	21
I.2 Alterações Cromossômicas Estruturais	22
I.3 Correlação Genótipo-Fenótipo	28
I.4 Técnicas de Estudo Cromossômico.....	31
Justificativa.....	37
Objetivos.....	40
III.1 Objetivo Geral.....	41
III.2 Objetivos Específicos	41
Metodologia.....	42
IV.1 Casuística.....	43
IV.2 Material.....	47
IV.3 Métodos	47
IV.3.1 Citogenética Clássica	47
IV.3.2 Citogenética Molecular	49
IV.3.3 Citogenômica	50
IV.3.4 Análise de Metilação dos Genes de Interesse	53
IV.3.4.2 Padronização dos <i>primers</i>	54
IV.3.5. Avaliação da Expressão do gene <i>SPON2</i>	57
Resultados.....	59
V.1 Citogenética Clássica.....	60

V.1.1 Diagnóstico Citogenético	60
V.2 Diagnóstico Citogenético Molecular	63
V.2.1 Técnica de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	63
V.3 Diagnóstico Citogenômico.....	66
V.3.1 Técnica de Hibridação Genômica Comparativa por microarranjo (<i>array</i> -CGH) ...	66
V.3.2 Investigação Citogenômica das pacientes P1 e P2.....	67
V.3.3 Investigação citogenômica realizada nos portadores do rearranjo aparentemente equilibrado.....	71
V.4 Diagnóstico Definitivo.....	73
V.5 Análise de Metilação dos genes <i>FGFRL1</i> e <i>SPON2</i>	74
V.6 Análise de Expressão do gene <i>SPON2</i>	76
Discussão	78
Conclusões.....	96
Referências	99
Apêndices	113
Anexos.....	131

Introdução

I.1 Citogenética Clínica

Os cromossomos desempenham papel relevante na transmissão da informação genética de uma geração para outra. Assim sendo, a estabilidade cromossômica em qualquer organismo é fundamental para seu desenvolvimento harmonioso. Como os cromossomos contêm os genes, quaisquer mudanças em sua estrutura ou número podem alterar a expressão gênica, resultando em indivíduos inviáveis ou com fenótipo anormal (MERGENER et al., 2011).

Diante desse panorama, a citogenética clínica desempenha papel relevante para o diagnóstico e entendimento das causas de várias doenças humanas, uma vez que consiste no estudo dos cromossomos, de sua estrutura e sua herança, aplicado a prática da genética médica (THOMPSON & THOMPSON, 2008).

De acordo com a literatura, as anormalidades cromossômicas são responsáveis por mais de sessenta síndromes identificadas, afetando, no mínimo, 7,5% das concepções. Entretanto, mesmo sendo um número bastante expressivo, a ocorrência de nascimentos com alguma alteração cromossômica é de apenas 0,7%. A diferença entre o número de concepções afetadas por anormalidades cromossômicas e o número de nascimentos, pode ser justificada pela severidade das alterações responsáveis pelo aumento da frequência de abortamentos espontâneos, óbitos fetais e natimortos. Os nascidos vivos, por sua vez, frequentemente apresentam alterações fenotípicas e malformações congênitas (MORAES et al., 2005; GAO et al., 2012).

Tais anomalias cromossômicas podem ser subdivididas em numéricas e estruturais. As numéricas incluem alterações no número diploide de uma espécie, enquanto que as estruturais podem envolver um, dois ou mais cromossomos e resultam de quebras seguidas de reconstituição cromossômica anormal. Estas podem produzir alterações herdáveis, quando ocorrem em linhagens de células germinativas, ou alterações *de novo* quando derivadas de

erros durante a divisão celular pós zigótica (BAPTISTA et al., 2005; ROUKOS & MISTELI, 2014). Os principais mecanismos moleculares que levam às referidas alterações incluem erros na separação dos cromossomos durante a meiose, perda do centrômero e consequente perda do braço cromossômico, quebras cromossômicas e pareamento desigual de regiões repetitivas (NAGAOKA et al., 2012).

I.2 Alterações Cromossômicas Estruturais

Os rearranjos estruturais podem acometer qualquer região ao longo da estrutura cromossômica. Há, entretanto, regiões no genoma com maior susceptibilidade à ocorrência desses fatores. Essas regiões são pequenas cópias repetidas de DNA altamente conservadas durante o processo evolutivo e conhecidas como *low copy repeats* (LCRs) (WATSON et al., 2014). As principais alterações estruturais incluem as translocações, as inversões, as deleções e as duplicações (Figura 1.a).

Estima-se que os rearranjos cromossômicos estruturais estejam presentes em aproximadamente 1 a cada 500 nativos. Tais alterações podem ser classificadas como equilibradas ou não equilibradas dependendo se ocorre ou não, a presença ou ausência de material adicional. Estas, quase sempre, determinam mudanças nas sequências dos genes, resultando em fenótipos alterados (GRIBBLE et al., 2005; CHEN et al., 2010). Dentre as anomalias estruturais a que mais se destaca é a translocação, caracterizada pela troca de material genético entre os pares cromossômicos. Sua frequência aproximada é de 0,6% em casos de infertilidade conjugal e de até 9,2% em casais com histórico de abortamentos recorrentes (VOZDOVA et al., 2012). São consideradas clinicamente importantes, uma vez que estão associadas a diversas doenças humanas como o câncer e a esquizofrenia (MITELMAN et al., 2007).

Existem dois tipos básicos de translocação, as recíprocas e as robertsonianas. As recíprocas acontecem quando há quebras em dois cromossomos distintos e seu material genético é mutuamente trocado, enquanto que nas robertsonianas as quebras ocorrem nos centrômeros dos pares acrocêntricos, os braços curtos são perdidos e os longos unem-se pelo centrômero (MERGENER et al., 2011). Dependendo da localização dos pontos de quebra, as translocações podem levar à desregulação da expressão gênica, ao desmascaramento de mutações recessivas por meio de deleções no cromossomo homólogo, ou até mesmo à perda de função, conforme ilustrado na Figura 1.b (KLOOSTERMAN & HOCHSTENBACH, 2014; WECKSELBLATT et al., 2015).

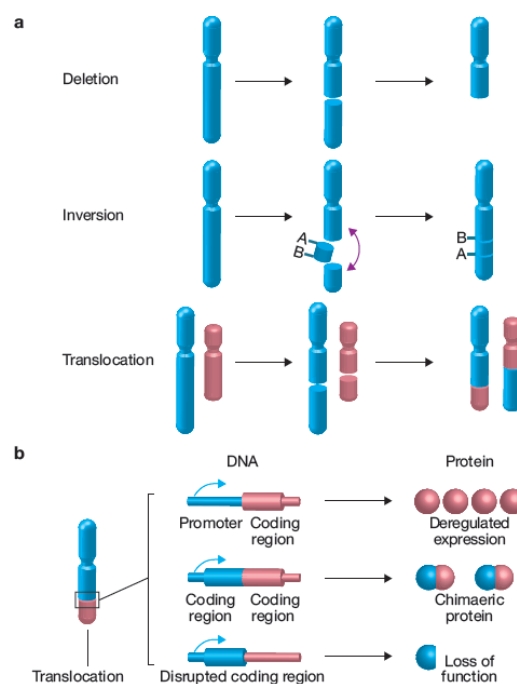


Figura 1: Consequências dos rearranjos cromossômicos. (a) Quebras cromossômicas podem resultar em perda do material genético (deleção), quando duas quebras ocorrem no mesmo cromossomo, o pedaço resultante pode ser invertido e reinsertado no cromossomo (inversão), ou o material genético pode ser transferido para outro cromossomo, em um processo chamado translocação. (b) A translocação pode causar desregulação da expressão, formação de uma proteína quimérica ou perda de função gênica (ROUKOS & MISTELI, 2014).

Nas condições aparentemente equilibradas, os portadores geralmente não apresentam sinais ou sintomas clínicos, sendo essas alterações mais facilmente transmitidas à prole.

Contudo, mesmo portadores de translocações equilibradas podem gerar gametas com desequilíbrios cromossômicos, sendo assim, importantes disseminadores de alterações genéticas para as gerações seguintes (BENN, 2010; SCHLUTH-BOLARD et al., 2013).

Aproximadamente 80% das alterações cromossômicas não são originadas *de novo*, mas sim, transmitidas por um dos pais. A segregação meiótica dos cromossomos envolvidos nos rearranjos, bem como de seus homólogos normais, pode levar à produção de gametas com desequilíbrios estruturais, resultando em abortos espontâneos ou progênie com fenótipo anormal. Um estudo citogenético realizado em casais com histórico de abortamentos de repetição detectou que, em 3-6% desses casais, um dos membros era portador de rearranjo estrutural equilibrado (FRANSSEN et al., 2006).

Para um melhor entendimento da constituição cromossômica presente na prole de portadores de translocações, deve-se considerar que tais indivíduos produzem tipos diferentes de gametas em relação aos homólogos normais e o cromossomo envolvido na translocação, que também pode ser chamado cromossomo derivativo (ISCN, 2013; ZHANG et al., 2015).

Durante a gametogênese dos portadores de translocação recíproca, o pareamento dos cromossomos na meiose I ocorre por meio da formação de uma figura quadrivalente em forma de cruz. Como se trata de um pareamento no qual estão envolvidos quatro centrômeros, estes podem, ou não, distribuir-se de maneira adequada para os polos opostos da célula, tornando a disjunção cromossômica um fenômeno extremamente incerto, podendo gerar gametas aneuplóides, portadores de translocação equilibrada ou não equilibrada, como demonstrado na Figura 2 (KARAKUS et al., 2012).

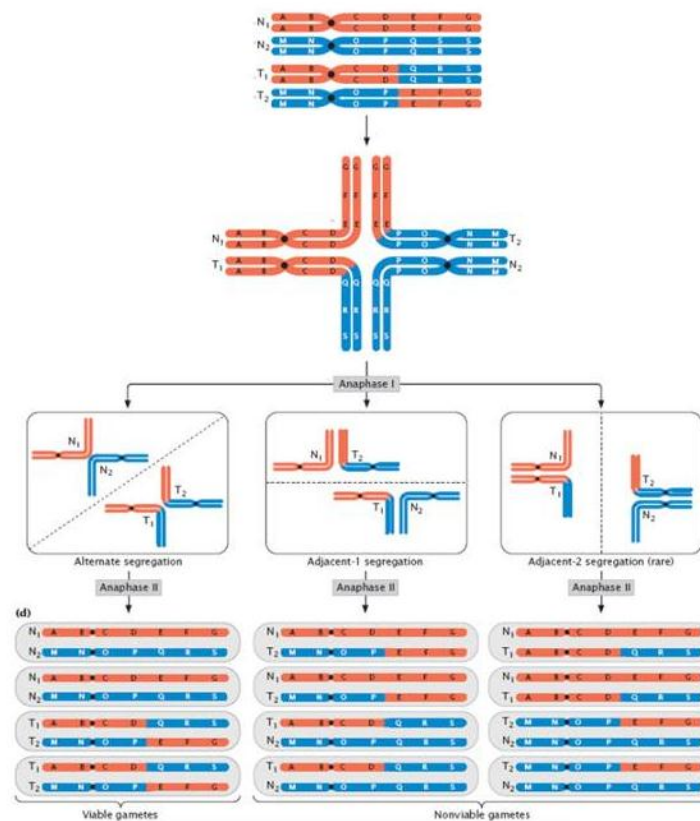


Figura 2: Esquema da segregação meiótica em portadores de translocação recíproca. Após a formação da tétrade durante a divisão celular, os cromossomos podem segregar-se de três diferentes maneiras gerando gametas viáveis e não viáveis (PIERCE, 2004).

De acordo com a literatura, a produção de espermatozoides não equilibrados em portadores de translocação recíproca varia de 20 a 77%, com um risco teórico de 50%. Nesses casos a segregação pode ocorrer por mecanismos diversos, como 2:2 (alternada, adjacente 2), 3:1 ou menos comumente 4:0. Na disjunção alternada, os cromossomos rearranjados segregam-se para um dos polos, enquanto os cromossomos normais migram para o lado oposto, produzindo gametas equilibrados e normais respectivamente. Gametas não equilibrados são gerados por meio dos mecanismos adjacentes 1 e 2, e pelas segregações 3:1 e 4:0. Na disjunção adjacente 1, os centrômeros homólogos movem-se para polos opostos, enquanto que na adjacente 2 dirigem-se ao mesmo polo. Em ambos os casos, ocorrerá a formação de gametas aneuplóides, deletados ou duplicados (SUGIURA-OGASAWARA et al., 2004).

Templado e colaboradores (2005) demonstraram que a frequência de espermatozoides com alguma alteração cromossômica em homens normais é estimada em 8,6%, dos quais 1,8% são aneuplóides, 0,2% diplóides e 6,6% são portadores de alguma alteração estrutural. No entanto, essa frequência é muito maior nos portadores de translocações, sendo que análises cromossômicas de espermatozoides mostraram resultados que variam entre 9% a 77%. Outros estudos citogenéticos moleculares evidenciaram que pacientes portadores de translocações robertsonianas podem produzir de 3,4 a 40% de espermatozoides anormais, enquanto que em casos de translocações recíprocas esse número varia de 47,5 a 81% (ROUSSEAU et al., 1995; MOREL, et al., 2001).

Quando uma translocação recíproca se estabelece, pequenos desequilíbrios genômicos podem ocorrer mesmo em indivíduos com fenótipo normal, sendo as regiões dos pontos de quebra mais complexas do que o esperado (WATSON et al., 2014). Gajecka e colaboradores (2008) sequenciaram o ponto de quebra de quatro pacientes fenotipicamente normais, portadores de translocação aparentemente equilibrada envolvendo os pares 1 e 22 $t(1;22)(p36;q13)$. Foram identificadas microdeleções e microduplicações nas junções dos pontos de quebra, demonstrando a alta complexidade dos mecanismos envolvidos, não apenas durante as quebras, mas também no processo de reparo do DNA no momento em que ocorreu o rearranjo estrutural.

Embora muitos portadores de translocações equilibradas sejam fenotipicamente normais, não raramente são descritas translocações aparentemente equilibradas com o desenvolvimento de fenótipos alterados. Papadopoulou e colaboradores (2010) relataram um paciente diagnosticado como portador de translocação equilibrada $46,XY,t(9;15)(q31;q26)$, que apresentava características fenotípicas como deficiência intelectual, face dismórfica, hipotonia, além de malformações cardíacas e renais. A investigação citogenômica por Hibridação Genômica Comparativa por microarranjos (*array*-CGH) detectou uma duplicação

de aproximadamente 5,8Mb no braço longo do cromossomo 9 (9q34.1→9q34.3) e deleções em três regiões distintas do braço longo do cromossomo 15, além de uma inversão, confirmada por FISH, em (15q21.1→15q21.2).

Diferentes mecanismos têm sido identificados ou sugeridos para explicar a associação entre rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e expressão fenotípica. Uma das explicações mais óbvias é a interrupção de genes, gerada pelas quebras cromossômicas, que podem danificar inclusive elementos reguladores (UTAMI et al., 2014; SUZUKI et al., 2014). Whalley e colaboradores (2015) relataram um caso de disrupção do gene *DISC1*, causada por translocação equilibrada t(1;11)(q42.1;q14.3). Esse gene está ligado a vários processos do desenvolvimento neurológico e apresenta elevada expressão no sistema nervoso central. Apesar das bases moleculares da t(1;11) ainda não serem completamente compreendidas, foi demonstrado que a disrupção gênica gerada pela alteração estrutural está associada com a redução da substância branca no cérebro e, possivelmente, tenha papel relevante no desenvolvimento de doenças psiquiátricas nos pacientes portadores dessa alteração.

A expressão de genes situados próximos aos pontos de quebra também é um fator a ser investigado, já que esta pode ser alterada devido ao denominado “efeito de posição”. Nesse caso, o rearranjo não altera diretamente o gene ou sua região promotora, mas a mudança de posição pode separar o gene de seu elemento regulador ou pode aproximá-lo da região reguladora de outro gene, levando à expressão de fenótipos distintos, dependendo da severidade e do tipo de elemento regulador afetado (RIPPEY et al., 2013). Esse fenômeno foi observado por Lettice e colaboradores (2011) em um paciente com inversão do cromossomo 7, inv(7)(q36.3;q22.1). A inversão culminou no deslocamento do gene *SHH*, colocando-o sob controle de outra região regulatória, acarretando no desenvolvimento de holoprosencefalia.

I.3 Correlação Genótipo-Fenótipo

A correlação entre o genótipo e o fenótipo de um paciente pode ser definida como a associação entre a presença de uma determinada alteração gênica (genótipo) e sua característica física resultante (fenótipo), que pode ser caracterizada por uma anormalidade ou um padrão de anormalidades, em um determinado indivíduo (GENETICS HOME REFERENCE, 2015).

Segundo Gardner e colaboradores (2012), a ocorrência de deleções ou duplicações pontuais em diferentes segmentos do DNA pode revelar a contribuição de uma determinada região para o aparecimento de um fenótipo específico, tornando possível a construção de mapas de ligação entre as alterações fenotípicas dos pacientes e as alterações genéticas possivelmente associadas a elas.

A definição precisa da arquitetura local onde ocorreu o rearranjo cromossômico é o primeiro passo para compreensão das causas de muitas doenças genéticas (TOMMERUP, 1993). O sequenciamento dos pontos de quebra e junção em translocações ou inversões propicia uma visão direta dos genes envolvidos nos rearranjos, os quais podem ser candidatos para o desenvolvimento de várias alterações fenotípicas observadas nos pacientes (SCHLUTH-BOLARD et al., 2013). Chen e colaboradores (2008) ao mapearem os pontos de quebra em pacientes portadores de translocações equilibradas, encontraram disrupção em três genes candidatos ao desenvolvimento de deficiência intelectual, descritos como possíveis causadores desse fenótipo.

O mapeamento dos pontos de quebra em dois casos de translocações aparentemente equilibradas envolvendo os cromossomos t(7;17) e t(17;20) também foi importante para a identificação de alterações nos elementos reguladores *upstream* a *SOX9*, sugerindo que modificações no padrão de expressão temporal ou espacial desse gene possam resultar em

displasia campomélica acampomélica nos portadores de tal rearranjo (FONSECA et al., 2013).

Por meio da técnica de *array*-CGH, Lyle e colaboradores (2009), propuseram-se a identificar a correlação genótipo-fenótipo em portadores da trissomia parcial do cromossomo 21. É sabido que vários dos achados fenotípicos da síndrome de Down (SD) incluindo deficiência intelectual, defeitos cardíacos e predisposição precoce ao Alzheimer estão relacionados com a presença de uma cópia extra do gene *HSA21*, localizado na citobanda 21q22.3 (WISEMAN et al., 2009). No entanto, o trabalho deste grupo sugeriu a existência de várias regiões susceptíveis, que englobam outros genes candidatos para o desenvolvimento do fenótipo encontrado nos casos de SD, contrariando a presença de uma região crítica para a manifestação do fenótipo.

Posteriormente, em 2014, Liedén e colaboradores descreveram um caso de correlação genótipo-fenótipo, no qual o paciente, portador de deficiência intelectual, dificuldade de linguagem, fenda palatina e malformações dentárias, possuía uma duplicação intragênica originada *de novo* em *SATB2*. As técnicas de *array*-CGH e de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram identificar um ganho de aproximadamente 35Kb correspondente à posição genômica (chr2:200,228,772–200,263,785). De acordo com a literatura, alterações nesse gene podem gerar fenótipos variados, que incluem deficiência intelectual, convulsões, alterações de comportamento, fenda palatina, micrognatia, anormalidades dentárias e osteoporose, englobando vários dos achados clínicos observados no paciente.

O estabelecimento da correlação entre a alteração genética observada e o surgimento do fenótipo pode, entretanto, ser dificultado pela ocorrência de mecanismos epigenéticos. Por definição, epigenética é o estudo das mudanças nas funções gênicas, mitoticamente herdáveis

que não podem ser explicadas por alterações na sequência da molécula de DNA (WU & MORRIS, 2001).

A modificação epigenética mais estudada em mamíferos é a metilação de dinucleotídeos CG, a qual apresenta-se como um mecanismo importante na regulação da atividade gênica, na estrutura da cromatina e na estabilidade genômica (BIRD, 2002). Nesse processo, o carbono 5' de citosinas seguidas por guaninas, é usualmente modificado por um grupo metil, por meio de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT's), formando o grupamento 5-metilcitosina (5mC). O mesmo acontece com o resíduo de citosina complementar que também é simetricamente metilado. As regiões ricas em CG são denominadas ilhas CpGs, normalmente encontradas nas regiões promotoras ou nos sítios de início de transcrição, sendo a expressão gênica, geralmente reprimida quando essas regiões se tornam hipermetiladas (NAKAO, 2001; OHKI et al., 2001).

A metilação do DNA é considerada a chave molecular para a ocorrência de outro processo epigenético bastante conhecido, o *imprinting* (marcação) genômico. Este está relacionado à metilação do DNA, uma vez que os genes controlados por *imprinting* apresentam como característica sequências ricas em ilhas CpGs (SURANI, 1998). Ao contrário do que normalmente ocorre em células diploides, onde os genes autossômicos apresentam expressão dos alelos maternos e paternos de maneira compensada, no *imprinting* genômico apenas um dos alelos do gene é expresso, de acordo com a sua origem parental (REIK & WALTER, 2001; LAWSON et al., 2013). Atualmente, em humanos, de uma lista de 243 genes candidatos controlados por *imprinting*, 95 estão confirmados e grande parte do restante encontra-se como predito *in silico* ou em situação desconhecida (GENE IMPRINTING, 2015).

I.4 Técnicas de Estudo Cromossômico

O desenvolvimento da citogenética humana tomou novas proporções a partir de meados da década de 50, quando Tjio e Levan criaram técnicas eficazes de hipotonização e fixação do material biológico permitindo uma melhor visualização e análise cromossômica. A partir desse momento, foi estabelecido que o número diploide normal da espécie humana era de 46 cromossomos. Desde então, tornou-se possível a associação entre anomalias cromossômicas específicas e doenças (FERGUSON-SMITH, 2015). O momento ideal para se estudar os cromossomos humanos é durante a divisão mitótica, na metáfase. O material mais adequado para esse tipo de estudo são os linfócitos de sangue periférico, uma vez que esse material é simples de ser coletado e as células dividem-se facilmente *in vitro*, sob condições ideais (TURNPENNY & ELLARD, 2009).

O método padrão mais rotineiramente empregado para o diagnóstico citogenético é o cariótipo por bandamento GTG. Essa técnica permite além do pareamento inequívoco dos pares cromossômicos a visualização de rearranjos estruturais como inversões, deleções, duplicações, translocações e cromossomos em anel (GOUAS et al., 2008). O nível de resolução do bandamento GTG para os cromossomos humanos é da ordem de 300 a 550 bandas, dependendo do grau de condensação dos mesmos, sendo esta técnica, portanto, limitada para rearranjos cromossômicos pequenos ou complexos de aproximadamente 5 a 10Mb (ISCN, 2013).

O desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à citogenética trouxe maior precisão na caracterização desses rearranjos. A técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) é baseada na detecção de sondas de DNA hibridadas a sequências complementares em cromossomos, sendo um avanço importante para os estudos citogenéticos, já que apresenta uma resolução que varia de 100Kb a 5Mb, permitindo a identificação de alterações sutis não detectadas pelo bandamento GTG, como microdeleções ou microduplicações, além da

detecção de sequências específicas de DNA em cromossomos, células ou tecidos morfológicamente preservados (PINKEL et al., 1986). Em relação aos rearranjos cromossômicos equilibrados, a FISH permite refinar a localização dos pontos de quebra, além de identificar alterações nos cromossomos envolvidos nos rearranjos (NATARAJAN & BOEI, 2003).

A citogenética molecular engloba, ainda, as técnicas de Cariótipo Espectral (SKY) e multicolor FISH (m-FISH). Nessas técnicas, a marcação específica de cada cromossomo é feita utilizando-se diferentes combinações de fluorocromos. Em um único experimento pode-se analisar todos os cromossomos humanos, o que é particularmente vantajoso na identificação de material cromossômico de origem desconhecida, como no caso de cromossomos marcadores supranumerários, material adicional e rearranjos complexos, como os que ocorrem em câncer (SMEETS, 2004; BINT et al., 2013).

Apesar dos avanços trazidos pela citogenética molecular na resolução da análise cromossômica, ainda havia a necessidade de um estudo detalhado de todo o genoma do indivíduo, a fim de obter uma correspondência entre a possível alteração genética e o fenótipo do paciente. Tal necessidade, aliada ao desenvolvimento científico e tecnológico, impulsionou o surgimento da citogenômica, área que estuda com alta resolução, a estrutura e composição de todos os cromossomos simultaneamente (AHN et al., 2013).

Desde então, a hibridação genômica por microarranjos (*microarrays*) tornou-se uma importante ferramenta na detecção de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos e tem sido utilizada na elucidação de pequenos rearranjos complexos (MILLER et al., 2010). Regiões com ausência de heterozigidade ou homozigotas também podem ser detectadas por plataformas capazes de analisar polimorfismos de nucleotídeo único, os *SNP-arrays*. O aparecimento de regiões com ausência de heterozigidade pode ser

indicativo da ocorrência de fenômenos como isodissomia uniparental, ou presença de regiões genômicas idênticas por descendência (SOUTH et al., 2013).

A resolução do microarranjo ou plataforma é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas em sua cobertura parcial ou total do genoma. Na técnica de Hibridação Genômica Comparativa por microarranjo (*array*-CGH), o DNA controle e o DNA teste são marcados com fluorocromos diferentes e competem pela hibridação com sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina; perdas e ganhos de segmentos genômicos são identificados devido a diferenças na intensidade de luz emitida (Figura 3). Os primeiros *arrays* utilizavam sondas clonadas em BACs (cromossomos artificiais de bactérias), porém plataformas mais recentes são formadas por oligonucleotídeos como alvos de hibridação. Esses *oligoarrays* permitiram, além de maior flexibilidade na confecção de sondas, uma maior cobertura genômica e resolução superior aos *arrays* de BAC (ZHANG et al., 2009).

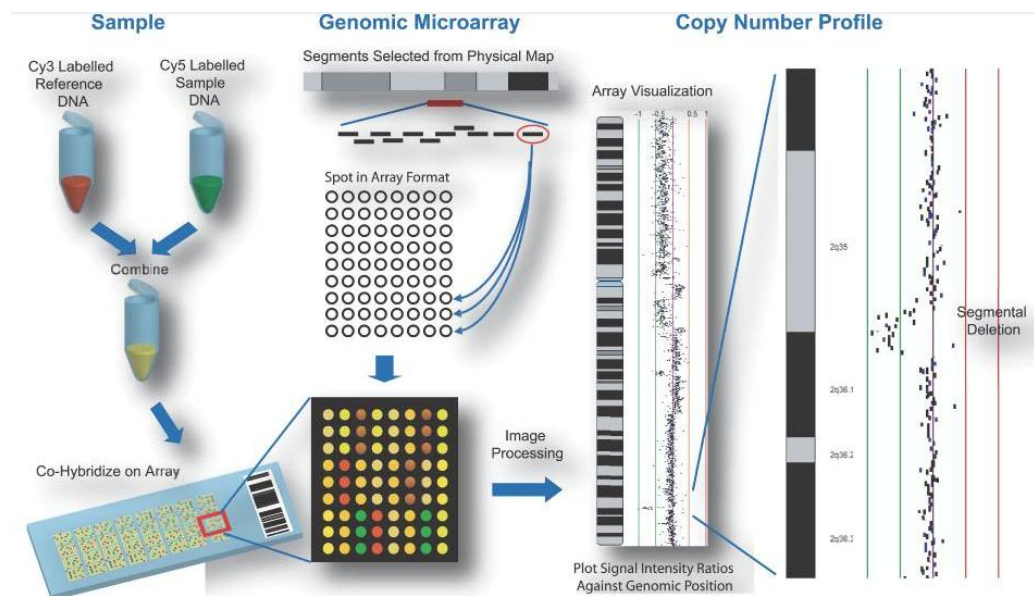


Figura 3: Ilustra a técnica de *array*-CGH. Nessa técnica o DNA referência e o DNA da amostra são diferencialmente marcados com fluoróforos que competem pela hibridação do DNA genômico. A razão entre o sinal de fluorescência reflete a variação no número de cópias em relação ao genoma de referência (CHARI et al., 2006).

A incorporação desta técnica aumentou o poder de resolução da análise cromossômica global, do nível de megabase (Mb) para kilobase (Kb) e, conseqüentemente, alterações cromossômicas não detectáveis pelas técnicas de citogenética clássica (como o bandamento GTG) e até mesmo pela citogenética molecular (como a FISH) passaram a ser detectadas. Outra vantagem desse método é a possibilidade de construir plataformas customizadas, específicas para determinadas regiões de interesse. O *array*-CGH, no entanto, não é indicado para análise de casos com baixo índice de mosaicismo e rearranjos equilibrados, além de não ser capaz de elucidar o mecanismo pelo qual ocorreu a alteração (SOUTH et al., 2013).

Após extensa revisão na literatura, o *International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium* recomendou a aplicação inicial da técnica de microarranjos no estudo de pacientes portadores de malformações congênitas múltiplas, transtornos do espectro autista (TEA), atraso de desenvolvimento ou deficiência intelectual de causas genéticas desconhecidas. O alto custo da técnica seria compensado pela elevada taxa de detecção de alterações, entre 15-20%, em comparação aos 3% detectados pelo bandamento GTG. O estudo preconizou, ainda, que a análise por bandamento GTG fosse indicada especificamente para pacientes com suspeitas de síndromes cromossômicas conhecidas, histórico de alterações cromossômicas na família ou abortamentos de repetição (MILLER et al., 2010).

Um trabalho publicado por Rosenberg e colaboradores (2006), analisando pacientes portadores de deficiência intelectual e malformações congênitas sem causa conhecida mostrou que desequilíbrios submicroscópicos estavam presentes em 15-20% dos casos. Em relação ao diagnóstico de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados, a aplicação da técnica permitiu a identificação de desequilíbrios genômicos em 30-60% dos pacientes que apresentavam fenótipo alterado (SISMANI et al., 2008).

O advento da citogenômica, além de refinar a análise de pequenas alterações cromossômicas, permitiu também a descoberta de uma ampla variação na estrutura do DNA genômico incluindo, principalmente, deleções, duplicações e inserções. Uma classe especial desta variação são as chamadas variações no número de cópias (CNVs - do inglês *Copy Number Variations*) (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2010). Estas caracterizam-se por envolver segmentos de DNA maiores que 1 Kb, são geralmente herdáveis e vistas como fonte de diversidade entre os indivíduos saudáveis. Estima-se que aproximadamente 12% do genoma humano seja constituído por CNVs (LEE, 2007; CLANCY & SHAW, 2008).

Embora, a ocorrência de CNVs seja vista como um fenômeno variante da normalidade capaz de causar diferenças fenotípicas entre grupos étnicos distintos ou membros de uma mesma família, elas podem ser consideradas patogênicas, dependendo do tamanho e do local onde estão inseridas. As consequências fenotípicas da maioria das CNVs grandes ainda não estão bem caracterizadas e seus efeitos permanecem desconhecidos (PARK et al., 2011; COOPER et al., 2012). Sabe-se, no entanto, que as CNVs são mais propensas a contribuir para o fenótipo se elas contiverem genes com padrões temporais e espaciais de expressão (HEHIR-KWA et al., 2010).

Atualmente, os critérios adotados para avaliar se uma determinada CNV é relevante para o fenótipo do paciente são baseados nas semelhanças entre os achados clínicos e os rearranjos, na ausência de alterações na maioria dos indivíduos da população geral, bem como na segregação de uma CNV na família. Alterações *de novo*, por exemplo, podem ser patogênicas, enquanto que aquelas herdadas de genitores saudáveis não o são (RIGGS et al., 2012). Além disso, a consulta aos bancos de dados públicos, como o ECARUCA, DECIPHER, ISCA e PubMed para comparação entre os pacientes e o DGV (*Database of Genomic Variants*) para verificar se uma dada CNV ocorre em indivíduos sem alterações

fenotípicas, é indispensável para a rotina diagnóstica (KLOOSTERMAN & HOCHSTENBACH, 2014; NEWMAN et al., 2015).

Justificativa

Alterações cromossômicas estruturais estão potencialmente associadas ao desenvolvimento de doenças genéticas devido à disrupção, inativação ou alteração da dosagem gênica. Mesmo rearranjos aparentemente equilibrados podem ser responsáveis pela manifestação de fenótipos alterados como infertilidade, atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual e doenças neurocomportamentais (UTAMI et al., 2014).

Desde 1998, o Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) utiliza técnicas de citogenética clássica e molecular no auxílio da definição diagnóstica dos mais de 3.500 pacientes atendidos anualmente. Em média, são realizados 1.000 cariótipos anualmente, sendo que em doze anos foram diagnosticados 405 rearranjos cromossômicos estruturais (MARTELLI, 2010).

A incorporação da técnica de Hibridação Genômica Comparativa por microarranjos (*array*-CGH) às demais metodologias já utilizadas por nosso grupo de pesquisa não apenas aumentou o poder de detecção dos rearranjos cromossômicos, bem como promoveu a identificação e a caracterização de material genético adicional, cromossomos em anel e inversões cromossômicas, elevando os índices de diagnóstico em pacientes atendidos no serviço de Genética Médica desta unidade (GOMES, 2014).

Tendo em vista a importância da caracterização genômica de tais rearranjos para elucidação diagnóstica e maior conhecimento sobre os fatores envolvidos na correlação cariótipo-genótipo-fenótipo, nossa proposta é realizar a investigação citogenômica em membros de uma família portadora de translocação 4p;12q. Consideramos que a alta resolução dos métodos citogenômicos, associada às técnicas de biologia molecular, permitirão não apenas a definição precisa dos pontos de quebra envolvidos no rearranjo e consequente diagnóstico definitivo, mas também poderão colaborar para uma possível correlação genótipo-fenótipo nas pacientes portadoras de rearranjo cromossômico estrutural associado a alterações

fenotípicas. Tal investigação contribuirá, ainda, para a definição de riscos de recorrência para a futura descendência dos portadores de rearranjos aparentemente equilibrados, determinando o aconselhamento genético e conseqüente melhor assistência à família.

Nossa hipótese é que durante a segregação meiótica, diferentes alterações genômicas possam ter ocorrido nas regiões dos pontos de quebra cromossômica, levando ao fenótipo distinto observado nas pacientes portadoras do rearranjo estrutural não equilibrado.

Objetivos

III.1 Objetivo Geral

O objetivo principal é a caracterização citogenômica de duas pacientes e seus familiares portadores de rearranjo cromossômico estrutural envolvendo o braço curto do cromossomo 4 e o braço longo do cromossomo 12, para definição diagnóstica e estudo da correlação cariótipo-genótipo-fenótipo.

III.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o diagnóstico citogenético das pacientes e seus familiares, associando técnicas de citogenética clássica (bandamento GTG) e molecular (FISH), para definição diagnóstica e aconselhamento genético da família;
- ✓ Refinar a localização dos pontos de quebra cromossômica e caracterizar as regiões de perdas e ganhos genômicos envolvidos no rearranjo estrutural, por meio da técnica de *array*-CGH, para estabelecimento do diagnóstico preciso;
- ✓ Estabelecer a correlação entre o cariótipo, o genótipo e o fenótipo das pacientes para orientação prognóstica e maior conhecimento sobre o efeito da dosagem dos genes mapeados nas regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo sobre o fenótipo;
- ✓ Correlacionar a expressão fenotípica distinta observada nas pacientes e a origem parental do rearranjo cromossômico, por meio da investigação do padrão de metilação de genes preditos como controlados por *imprinting* materno e paterno.

Metodología

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em parceria com os Laboratórios de Citogenética, Hematologia e Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP).

IV.1 Casuística

A amostra foi composta por seis membros de uma família portadora de rearranjo cromossômico estrutural envolvendo o braço curto do cromossomo 4 (4p) e o braço longo do cromossomo 12 (12q). Inicialmente, foram investigadas duas pacientes, primas em primeiro grau, encaminhadas ao Ambulatório de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (GEN3-HCFMRP-USP) para elucidação diagnóstica. O estudo incluiu as duas pacientes que apresentavam alterações fenotípicas, assim como seus familiares, portadores de translocação $t(4p;12q)$ aparentemente equilibrada e fenótipo normal. O heredograma abaixo (Figura 4) identifica os membros de três gerações da família investigada, de acordo com o resultado do estudo citogenético.

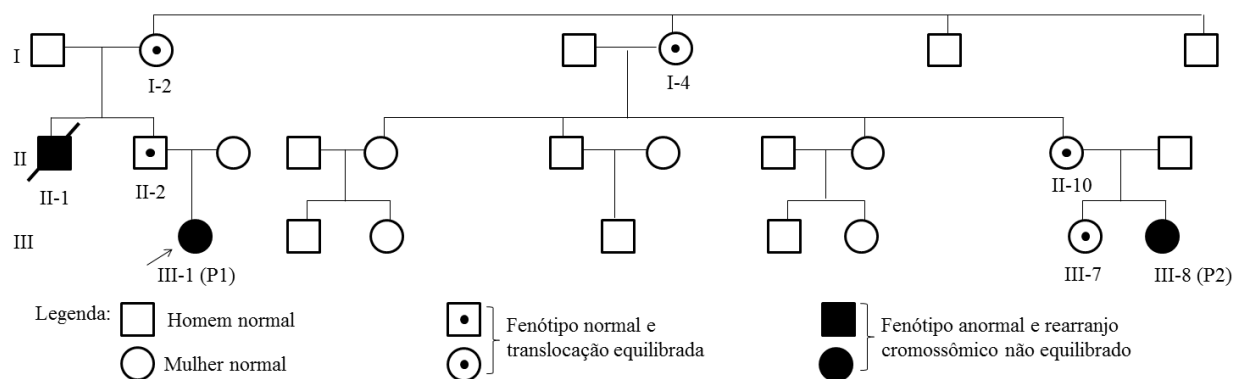


Figura 4: Heredograma da família estudada, representando os indivíduos com cariótipo e fenótipo normal; indivíduos com fenótipo normal e portadores de translocação $t(4p;12q)$ aparentemente equilibrada; e os pacientes portadores de malformações e rearranjo estrutural não equilibrado (afetados). A seta apontada para P1 indica o caso índice.

Os pacientes e familiares foram informados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I) referente à participação na pesquisa, aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP-HCRP CAAE nº 45432815.3.0000.5440) (Anexo II). A avaliação clínica dos mesmos foi realizada no Ambulatório de Genética Médica (GEN-3) pelo Dr. Carlos Henrique Paiva Grangeiro, sob coordenação da Prof. Dra. Lucia Regina Martelli e colaboração dos médicos assistentes e residentes do setor (Anexo III). Os pacientes II-1 e I-4, ambos com diagnóstico externo de alteração cromossômica, não foram avaliados pelo grupo, uma vez que II-1 foi a óbito antes do início da pesquisa e I-4 optou por não assinar o TCLE.

Apesar da alteração cromossômica comum caracterizada como derivativo do cromossomo 4 [der(4)], as duas pacientes portadoras do rearranjo estrutural não equilibrado (P1 e P2) apresentaram alguns achados fenotípicos diferentes ao exame físico, sumarizado na Tabela 1. A Figura 5 ilustra os achados clínicos observados nas duas pacientes (P1 e P2).

Tabela 1: Espectro fenotípico observado nas pacientes 1 e 2

	Características Fenotípicas	P1	P2
Performance	Deficiência mental	++	+++
	Distúrbio comportamental	+	+
	Convulsões		+
	Microcefalia	+	+
	Frontal amplo	+	+
	Baixa implantação capilar anterior	+	
Craniofacial	Face triangular	+	
	Hipoplasia de face média		+
	Orelha baixo implantada e rodada posteriormente		+
	Microtia à direita		+
	Orelha em concha à esquerda	+	++
	Apêndice pré-auricular		+
	Perda auditiva	+	+++
	Rarefação do terço distal da sobrancelha	+	+

	Proptose		+
	Astigmatismo	+	
	Telecanto		+
	Fenda palpebral oblíqua para cima	+	
	Ptose de pálpebras	+	
	Estrabismo de olho direito	+	
Craniofacial	Raiz nasal alta	+	+
	Ponte nasal alargada	+	+
	Nariz em bico		+
	Hipoplasia de aleta nasal		+
	Macrostomia		+
	Microretrognatia	+	++
	Oligodontia	+	
	Fenda de palato duro	+	
	Clinodactilia	+	
	Pés planos e valgos	+	+
Esquelético	Frouidão articular	+	+
	Escoliose	+	+
Crescimento	Hipotrofia muscular	+	+
Coronário	Sopro cardíaco	+	
	Fosseta sacral	+	+

*O número de caracteres “+” representa a gravidade do achado fenotípico.

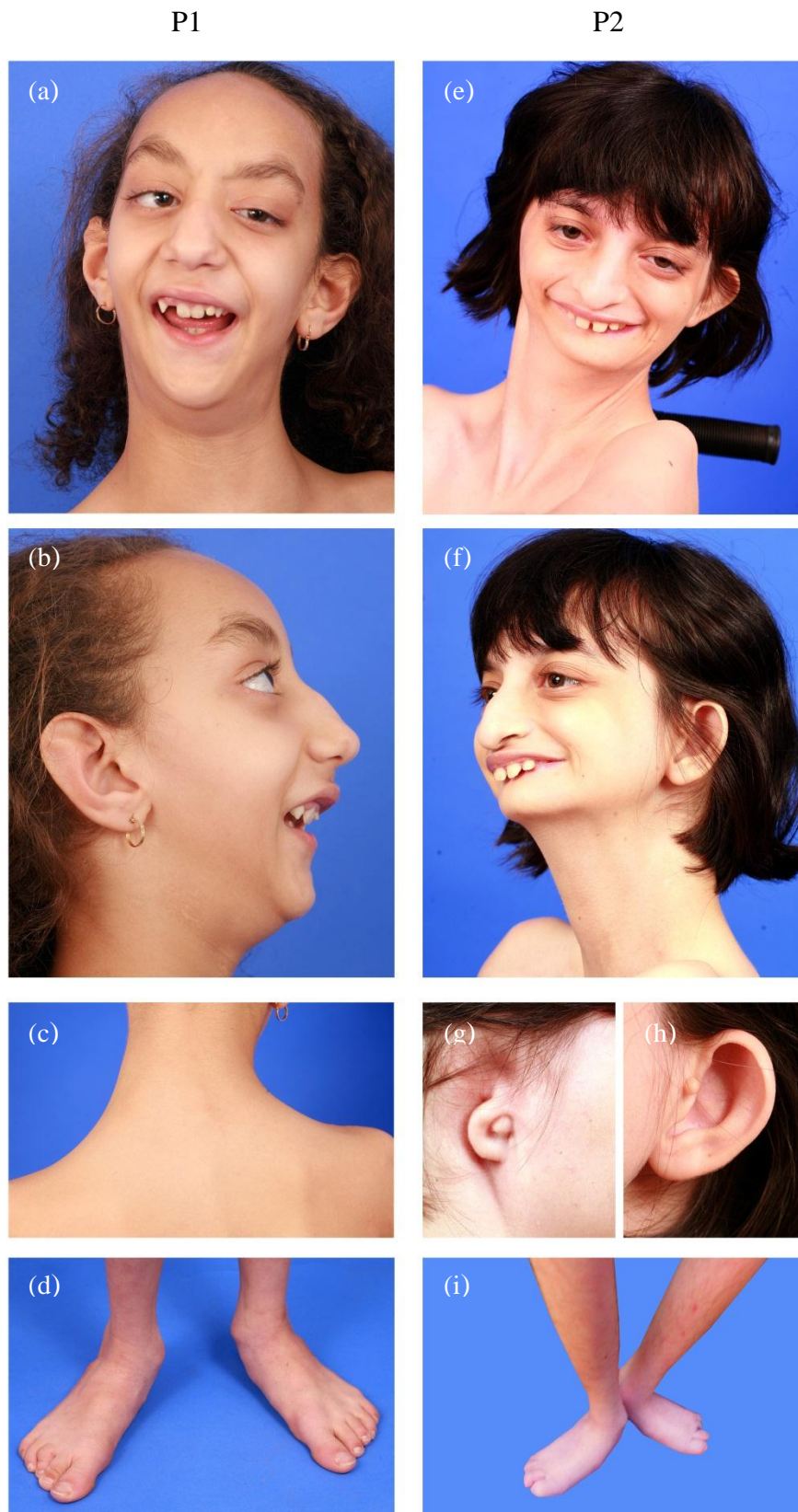


Figura 5: Quadro comparativo mostrando algumas das dismorfias observadas nas pacientes 1 e 2. Em (a) e (e) estão representados os aspectos craniofaciais das pacientes (P1 e P2); em (b) perfil facial de P1 evidenciando raiz nasal alta, microretrognatia acentuada e orelha baixo implantada; (c) pescoço alongado, assimetria escapular e hipotrofia muscular; (d) e (i) pés planos e valgos das pacientes P1 e P2; em (f) facies dismórfica com nariz em bico, microretrognatia e orelha esquerda de baixa implantação; (g) microtia à direita e (h) orelha esquerda em concha e apêndice pré-auricular.

IV.2 Material

Foram coletadas duas amostras de sangue periférico de cada indivíduo:

- a. Uma amostra de 5mL em tubo Vacutainer[®] contendo heparina sódica para estudo citogenético convencional por bandamento GTG e estudo citogenético molecular pela técnica de FISH.
- b. Uma amostra de 5mL em tubo Vacutainer[®] contendo EDTA para caracterização genômica por meio da técnica de *array*-CGH, análise de metilação e expressão dos genes de interesse.

IV.3 Métodos

IV.3.1 Citogenética Clássica

IV.3.1.1 Técnica de Cultura Temporária de Linfócitos (MOORHEAD et al.,

1960 modificada):

Uma aliquota de 500µL de sangue coletado foi cultivada em 5mL de meio RPMI 1640 (cat n°11875, GIBCO[®], Invitrogen) com L-glutamina suplementado com 2% de fitohemaglutinina (cat n°10576-015, GIBCO[®], Invitrogen), estreptomicina/penicilina (cat n°15140-148, GIBCO[®], Invitrogen) e 20% de soro bovino fetal (cat n°12657-029, GIBCO[®], Invitrogen) em estufa CO₂ a 37°C, por 72 horas. Quinze minutos antes de completar, as 72 horas, foram adicionados na cultura 0,3 mL de colchicina 0,0016% (cat n°C3915-1G, SIGMA[®]), retornando à estufa até completar o tempo de incubação. A colchicina impede a formação das fibras do fuso mitótico e o término do ciclo celular, parando assim a divisão celular na fase de metáfase.

Ao final do período de incubação (72h), o material foi centrifugado por 10 minutos a 120 x g e o sobrenadante descartado. Adicionaram-se 5 mL de solução hipotônica (KCl

0,075M) a 37°C e o material foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 37°C por 25 minutos. Foram adicionadas 10 gotas de solução *Carnoy* (3 metanol : 1 ácido acético) para interromper a ação da solução hipotônica e após homogeneização, os tubos foram novamente levados à centrifuga por 10 minutos a 120 x g. O sobrenadante foi retirado e o material fixado pela adição de 5mL de solução fixadora de *Carnoy* (3 metanol : 1 ácido acético). O material foi homogeneizado e mantido por 10 minutos em repouso a 25°C. Em seguida, centrifugado por 10 minutos a 120 x g e o sobrenadante descartado. A etapa de fixação foi repetida por mais duas vezes, sendo que da última vez a concentração da solução fixadora foi de 1 metanol : 1 ácido acético. Parte da suspensão celular resultante foi utilizada para a preparação das lâminas e o restante mantido em freezer a – 20°C.

IV.3.1.2 Técnica de Bandamento GTG (SCHERES, 1972):

Para obtenção do bandamento GTG as lâminas preparadas a partir de suspensão celular, obtidas por meio da cultura temporária de linfócitos, foram mantidas a 25°C por três a cinco dias e mergulhadas em tripsina (DIFCO 1:250) diluída a 0,1% em tampão fosfato (0,06M pH 6,8) por um a vinte segundos, dependendo do tempo de envelhecimento da lâmina. A ação da tripsina foi neutralizada com água destilada e, em seguida, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (MERCK®) (1:30) por 10 minutos. Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente para determinação do cariótipo. A análise microscópica foi realizada em microscópio Axio Imager.D2 (ZEISS®), em objetiva plan APO 100x, acoplado ao sistema computadorizado de análise *MetaSystems*, utilizando-se o *software* IKAROS para análise do padrão de bandas, montagem dos cariótipos e documentação dos resultados.

IV.3.2 Citogenética Molecular

IV.3.2.1 Técnica de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH)

Para a realização da técnica de FISH foram utilizadas sondas *locus* específica (LSI) marcadas com fluorocromos distintos, a fim de identificar com precisão os diferentes pares cromossômicos envolvidos nos rearranjos.

Foram utilizadas as sondas 4pter vermelha (LPT04PR) e 12qter verde (LPT12QG) ambas da Cytocell[®] (Cambridge, UK). A primeira cobre a região terminal do braço curto do cromossomo 4 correspondente à banda 4p16.3. A segunda, por sua vez, é complementar à região subtelomérica do braço longo do cromossomo 12 (12q24.33).

A técnica foi aplicada de acordo com o protocolo do fornecedor, com pequenas modificações. As lâminas, contendo o material biológico, foram envelhecidas por no mínimo três dias, em temperatura ambiente. Após esse período, foram incubadas em solução de 2xSSC a 25°C por dois minutos. Em seguida, o material foi desnaturado em solução de formamida 70% a 76°C por três minutos e desidratado em etanol 70%, 90% e 100% a 25°C, por um minuto. Após secas as lâminas, foram então aplicados 10µl da combinação de sondas, previamente desnaturadas em banho-seco a 74°C por 2 minutos. As lâminas foram vedadas e a hibridação ocorreu em *ThermoBrite* (Abbot Molecular[®], USA) mantendo a temperatura de 37°C, por aproximadamente 16 horas.

Após hibridação, as lâminas foram submetidas à lavagem em solução de 2xSSC/0,3% Igepal CA-630 (SIGMA[®]) a 72°C por dois minutos, coradas com solução de DAPI/*antifade* 1:1 (Vector Laboratories CA, USA) e armazenadas a -20°C em recipiente escuro, por no mínimo duas horas antes da análise. Foram analisadas e documentadas 10 metáfases por experimento. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager.D2 (ZEISS[®]), objetiva Plan APO 100x, acoplado ao sistema computadorizado de análise (MetaSystems[®], Germany) do Laboratório de Citogenética do HCFMRP, por meio

do *software* ISIS. Os critérios para análise das células metafásicas foram os descritos por Bayani & Squire (2004). As metáfases foram selecionadas quando a marcação de hibridação era homogênea, facilmente identificada, ou seja, quando sua intensidade era consistentemente maior que a intensidade de ligações não específicas ao citoplasma e restos celulares.

IV.3.3 Citogenômica

IV.3.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por meio do método *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* – Epicentre (US), a partir de 200 µL de sangue total coletado dos pacientes, seguindo as recomendações do fabricante. O material obtido foi estocado a -80°C após quantificação por *NanoDrop*, utilizando-se 2µL de cada amostra.

IV.3.3.2 Técnica de Hibridação Genômica Comparativa por Microarranjos (*array*-CGH)

A técnica de *array*-CGH foi realizada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP), no Laboratório de Hematologia, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci.

Para realização da técnica utilizamos o chip *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA). Essa plataforma possui 420.288 sondas em regiões não-variantes do genoma, com espaçamento médio de 5,3kb, permitindo a detecção de variações de número de cópias (CNVs), bem como ganhos e perdas em todo o genoma. Nesta técnica, o DNA genômico da amostra (DNA teste) e um DNA controle (DNA referência), adquirido comercialmente, são diferentemente marcados com as cores verde e vermelha e hibridados em lâmina contendo sondas referentes a todo o genoma humano.

A primeira etapa após a extração e quantificação do DNA foi a de fragmentação, realizada com o kit *Genomic DNA Enzymatic Labeling* (Agilent[®], USA). A solução de digestão foi preparada de acordo com as instruções do fornecedor, para os DNAs dos pacientes e seus respectivos controles, masculino e feminino, adquiridos da empresa Promega[®]. A reação de fragmentação foi preparada contendo, além das enzimas de restrição Alu I (10 U/ μ L) e Rsa I (10U/ μ L), água nuclease-free, tampão 10x e BSA acetilado (10 U/ μ L). Foram adicionados 5,8 μ L desta mistura a cada tubo de reação contendo 20,2 μ L de DNA genômico, completando um volume de 26 μ L. As amostras foram digeridas em termociclador, segundo o protocolo: 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos para inativação enzimática, e então mantidas a 4°C até a finalização manual do programa. Para verificação do tamanho dos fragmentos gerados, utilizamos 2 μ L de cada amostra em gel de agarose 2%, devendo apresentar entre 200 a 800 pb.

Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e do DNA controle com os fluoróforos, *Cyanine 3*-dUTP (Cy3) e *Cyanine 5*-dUTP (Cy5). Inicialmente, foram adicionados às amostras 5 μ L de *random primer* e novamente submetidas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 95°C e o segundo a 4°C até a finalização manual do programa. O *mix* de marcação foi preparado contendo água nuclease-free, tampão de reação 5x, dNTPs 10x e ExoKlenow, além dos fluoróforos Cy5 e Cy3. Foram então adicionados 21 μ L do *mix* de marcação em cada um dos tubos de reação contendo o DNA genômico, totalizando um volume de 50 μ L cada. As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando-se o mesmo programa da etapa de fragmentação.

A terceira etapa foi a de purificação, realizada com filtros Amicon 30kDa. Primeiramente, foram adicionados a cada amostra, 430 μ L de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrífuga e carregados com DNA marcado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 17.530 x g, em temperatura ambiente. Após o descarte

do filtrado, foram adicionados mais 480µL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O material retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto em temperatura ambiente a 358 x g, para obter a amostra purificada. O volume de cada amostra foi mensurado em pipeta e completou-se com TE 1x para um volume final de 41µl. Cada amostra foi então quantificada em *NanoDrop* para determinação do rendimento das cianinas. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com *cyanine-5* e *cyanine-3*, foram combinadas em um único *mix*, para análise genômica comparativa.

A etapa seguinte foi a de preparação do DNA marcado para a hibridação. Nesta etapa, foi preparada uma solução de hibridação com 212,5µL de Cot-1 DNA (1,0mg/mL), 221µL de 10x aCGH Blocking Agent e 1.105µL de tampão de hibridação 2x HI-RPM. Um volume de 181µL foi adicionado em cada tubo contendo o DNA marcado, totalizando 260µL. Após homogeneização por pipetagem, as amostras foram levadas ao banho seco a 95°C por 3 minutos e a 37°C por 30 minutos.

A plataforma utilizada permite a realização de dois experimentos por lâmina. Desta forma, na etapa de hibridação, 245µL do *mix* de hibridação misturados ao DNA foram aplicados em cada um dos campos da lamínula que foi unida à lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara de vedação. A mesma câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 65°C, 20 rpm, por 40 horas.

Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem Oligo aCGH I em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas, sendo a primeira lavagem feita com tampão Oligo aCGH I, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão Oligo aCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em acetoneitrila, também em agitação

magnética, por 10 segundos e mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos.

Após as lavagens, as lâminas foram posicionadas no suporte *SureScan* para serem escaneadas. Para o escaneamento das lâminas de *microarray*, utilizou-se o Agilent SureScan C Scanner G2505. O *software* “*The Feature Extraction*” v10.5, foi utilizado para a análise das imagens.

IV.3.3.3 Metodologia de Análise

Os dados gerados foram interpretados com o auxílio do *software Nexus Copy Number*, versão 7.0, desenvolvido pela Biodiscovery[®]. Esse *software* permite a visualização e análise de alterações no número de cópias de diversas plataformas como *array*-CGH, SNP *array* e sequenciamento de nova geração, possuindo integração com bancos de dados externos, como o DGV, o DECIPHER, o ISCA e o OMIM entre outros, fato que permite uma ampla análise dos resultados.

O *software Nexus 7.0* foi configurado com o *Fast Adaptive States Segmentation Technique* (FASST2), com um limiar de significância de 1.0E-5 e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 1.000 Kb. Sinais alterados incluíram três ou mais sondas adjacentes para serem considerados. Foi estimado para ganho, um limiar de 0,42; para alto ganho, limiar de 1,14; para perdas -0,62; e para perdas em homozigose -1,1. A interpretação dos resultados foi realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados *online* como o *Genome Browser* (GRCh37/hg 19), o *GeneCard*, o DGV, o DECIPHER v9.2, o RefSeq, o OMIM e o PubMed.

IV.3.4 Análise de Metilação dos Genes de Interesse

A análise genômica das regiões envolvidas no rearranjo cromossômico evidenciou quatro genes que poderiam ser controlados por *imprinting* genômico (*FGFRL1*, *KIAA1530*,

FBRSL1 e *SPON2*). Para análise de metilação, foram selecionados dois deles, os genes *FGFRL1* e *SPON2*, preditos como *imprinting* materno e paterno respectivamente.

A análise dos níveis de metilação dos dois genes de interesse foi realizada nas duas pacientes (P1 e P2) e seus respectivos genitores (II-2 e II-10) portadores do rearranjo cromossômico equilibrado, com auxílio do kit *MethylCollector Ultra*[®] (Active Motif, cat. n. 55005), seguida por PCR em tempo real, em parceria com o Laboratório de Oncologia Pediátrica do HCFMRP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone.

Esse kit utiliza um complexo proteico recombinante capaz de se ligar especificamente a dinucleotídeos CpGs metilados que serão posteriormente capturados por *beads* magnéticas de forma a enriquecer apenas os fragmentos de DNA contendo citosinas metiladas. O desenho, padronização dos *primers* e a fragmentação do DNA genômico antecederam a etapa de enriquecimento do DNA genômico.

IV.3.4.1 Estudo das regiões promotoras e desenho dos *primers*

A busca por ilhas CpGs foi realizada por meio das ferramentas *online MethPrimer* (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) e *Ensembl.org* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Foram estudadas duas das três ilhas CPGs observadas no gene *FGFRL1* e uma ilha encontrada no gene *SPON2*. Os *primers* foram desenhados e testados *in silico* com auxílio das ferramentas *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), respectivamente.

IV.3.4.2 Padronização dos *primers*

As amostras de DNA foram diluídas em série (1:1 a 1:10.000) para construção das curvas de eficiência dos *primers*, com cinco pontos. O cálculo da eficiência foi realizado com a fórmula: $E = [10^{a(-1/\text{slope}) - 1}] \times 100$, sendo o *slope* ideal aproximadamente -3,32; e $R^2 =$

0,999. A Tabela 2 apresenta os pares de *primers* e as padronizações realizadas. A curva de *melting* também foi obtida para visualização de possíveis reações inespecíficas. As reações foram feitas em placa de 96 poços, corridas no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®) acoplado ao *software* 7500 v2.0.4.

Tabela 2: Eficiências dos *primers* utilizados para análise de metilação dos genes *FGFRL1* e *SPON2*.

Gene	<i>Primers</i>	Temperatura de anelamento (°C)	Volume de <i>primer</i> (µL)	Ampli con (pb)	R ²	Eficiência (%)
<i>FGFRL1</i>	Ilha CPG 1 F:TGCCTTACGTGCTGTTTCA R:AGGCTTGGCAGAGAATGGAG	60,5	0.8	94	0,99	127
	Ilha CPG 2 F: CCATGGGGTTGGCTGAGGAT R: CACGTCCTGCCCTTAAAC	63	0.4	80	0,97	112
<i>SPON2</i>	F:GTAAAGACCGTGGGAGTGAC R: TTACAACACTAACAGCCCGC	60,5	0.6	105	0,978	109

Concentração do *Primer* 10 pmol/µL

Para a reação de amplificação foram utilizados 10 µL de SYBR Green® (Life Technologies), 2 µL de DNA, o volume adequado de cada par de *primers* e água livre de DNA e RNA para alcançar um volume final de 20 µL. A ciclagem compreendeu quatro passos: (1) 50°C – 2 minutos; (2) 95°C – 10 minutos; (3) 95°C – 15 segundos; (4) TM – 1 minuto (do 2 ao 4 por 40 vezes). Curva de *melting*: 95°C – 15 segundos; 60°C – 30 segundos; 95°C – 15 segundos.

A etapa antecedente ao enriquecimento das amostras consistiu na fragmentação mecânica do DNA genômico realizada em equipamento sonicador (Sonic – Vibra Cell®) sob as seguintes condições: 130 W, 20 KHz, 30% de amplitude, sendo realizados 8 pulsos com duração de 30 segundos e intervalos de 45 segundos por amostra. O produto da sonicação apresentou fragmentos de DNA entre 100 e 500 pares de base (pb). O enriquecimento do material foi feito com auxílio do kit *MethylCollector Ultra*® (Active Motif, cat. n. 55005), seguiu as recomendações do fabricante sucintamente descritas a seguir.

IV.3.4.3. Enriquecimento das amostras

Para cada amostra de DNA fragmentado (1 μg por reação), foi preparada uma reação contendo 10 μL de *beads* magnéticas, 100 μL de tampão de ligação, 0,5 μL de inibidor de protease e 10 μL do complexo de proteínas His-MBD2/MBD3L1. A reação foi incubada em rotação e agitação constantes no aparelho *HulaMixer*, (Life Technologies[®]) por uma hora a 4°C e em seguida, as *beads* foram lavadas em tampão de ligação. Após essa etapa foram acrescentados 100 μL do tampão de eluição e as amostras incubadas a 50°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com auxílio de barras magnéticas. Por fim, foram acrescentados 2 μL de proteinase K para que ocorresse a digestão do complexo proteico, restando apenas o material enriquecido. O esquema das etapas descritas acima está representado na Figura 6.

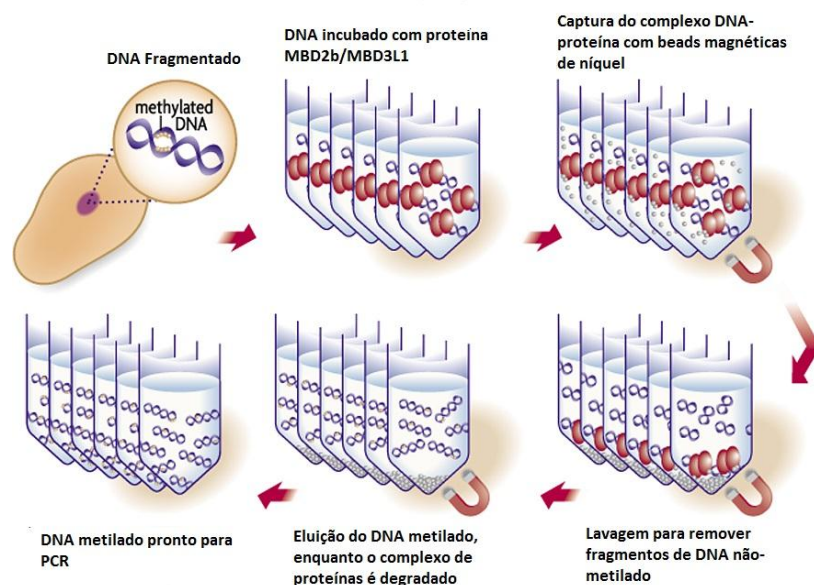


Figura 6: Esquema das etapas seguidas para enriquecimento das 5-metilcitosinas por meio do kit *Methylcollector Ultra* (Life technologies[®])

IV.3.4.4. PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para cada amostra de DNA enriquecido foi separada uma amostra *Input*, correspondente a 10% da concentração final de DNA presente no início da reação de enriquecimento, esse DNA foi diluído 20x (100 µL do volume final) e usado como controle. As amostras enriquecidas, denominadas de IP foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação dos níveis de 5-metilcitosina, com os *primers* desenhados nas condições padronizadas descritas na Tabela 2.

Com o objetivo de verificar a eficiência da reação de enriquecimento dos resíduos de 5-metilcitosina foram utilizados como controles positivos os genes *XIST* e *NBR2*, e como controle negativo o gene *GAPDH*. O enriquecimento da amostra IP com relação à amostra *input* foi calculado pela equação:

$$2^{[(Ct \text{ Input} - 2,99) - Ct \text{ IP}] / 100}$$

Onde Ct input e Ct IP são os ciclos em que as amostras alcançaram o *threshold*, estabelecido como 0,1 e o fator 2,99 é o fator de correção para a diluição (ln20). O enriquecimento relativo foi calculado dividindo o enriquecimento observado na região de interesse pelo enriquecimento observado para o controle negativo (*GAPDH*), fornecido pelo kit.

IV.3.5. Avaliação da Expressão do gene *SPON2*

A extração do RNA foi realizada com TRIZOL (Invitrogen[®], USA) a partir de sangue periférico dos pacientes e seus genitores (II-2; P1; II-10 e P2) conforme as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado e armazenado em freezer – 80°C até sua utilização. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity*, (Applied Biosystems[®], USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica nos indivíduos avaliados foi realizada utilizando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (sonda Taqman[®] - Life Technologies) para o gene *SPON2*. Foram utilizados como controles endógenos os genes *GUSB* e *GAPDH*. A amostra calibradora foi proveniente da extração de RNA a partir de sangue periférico de um indivíduo com cariótipo normal. Os experimentos foram realizados em equipamento 7500 *Fast Real Time System* (Applied Biosystems[®]). O volume final para cada reação foi de 10µL sendo utilizados 5,0 µL do *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems[®]), 0,5 µL de sonda e 4,5 µL de cDNA (diluído 1/20). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Resultados

V.1 Citogenética Clássica

V.1.1 Diagnóstico Citogenético

A investigação citogenética pela técnica de bandamento GTG realizada em três gerações da família estudada evidenciou que seis indivíduos apresentavam rearranjo cromossômico estrutural envolvendo os pares 4 e 12.

A análise citogenética revelou inicialmente presença de material adicional no braço curto do cromossomo 4 [der(4)], tendo sido identificada a inserção da porção distal do braço longo do cromossomo 12 no braço curto do cromossomo 4 (Figura 7.a), caracterizando o diagnóstico clínico de trissomia 12qter e descrito o cariótipo 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?) para as duas pacientes que apresentavam alterações fenotípicas, identificadas no heredograma como III-1 (P1) e III-8 (P2). As figuras 8 e 9 mostram os cariótipos em bandamento GTG das duas pacientes.

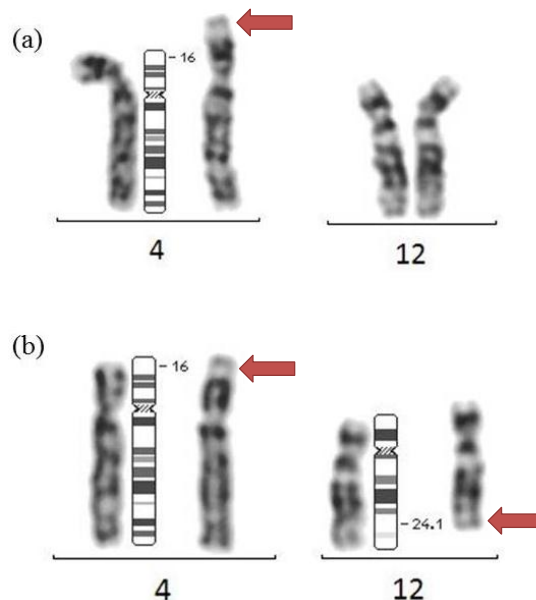


Figura 7: Imagem dos cromossomos envolvidos no rearranjo após aplicação da técnica de bandamento GTG e seus respectivos ideogramas. (a) Cariótipo parcial de uma paciente portadora do rearranjo não equilibrado onde a seta indica o local de inserção da porção distal do braço longo do cromossomo 12 no braço curto do cromossomo 4. (b) Cariótipo parcial de um portador de translocação aparentemente equilibrada, onde as setas indicam os pontos de quebra ocorridos nos cromossomos 4 e 12.

A investigação citogenética dos demais membros da família identificou quatro portadores de translocação 4p;12q aparentemente equilibrada (Figura 7.b), três mulheres e um homem, identificados no heredograma como I-2 (avó paterna de P1), II-2 (pai de P1), II-10 (mãe de P2) e III-7 (irmã de P2).

Consequentemente, o cariótipo dos portadores possibilitou a determinação da origem parental do rearranjo cromossômico. A figura 10 ilustra o cariótipo 46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?) de uma portadora de translocação aparentemente equilibrada. Os diagnósticos citogenéticos por bandamento GTG das pacientes 1 e 2 e dos portadores do rearranjo aparentemente equilibrado estão descritos na Tabela 3. Os cariótipos de todos os membros avaliados constam do Apêndice I.

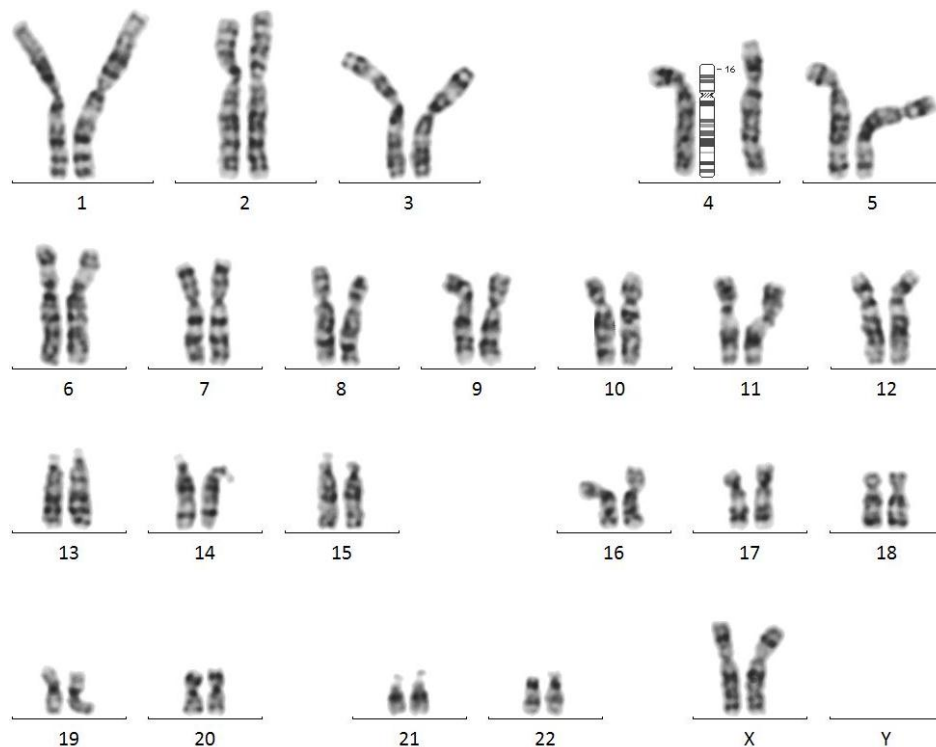


Figura 8: Cariótipo por bandamento GTG da paciente **P1**, portadora de rearranjo envolvendo os pares cromossômicos 4 e 12 com diagnóstico citogenético 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?).

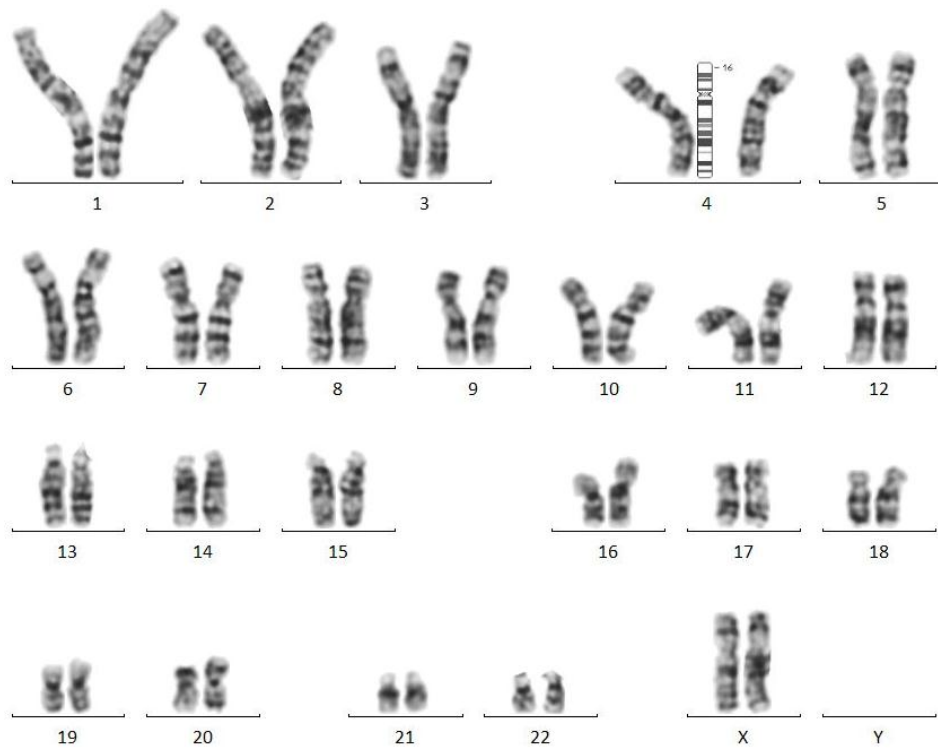


Figura 9: Cariótipo por bandamento GTG da paciente **P2**, portadora de rearranjo envolvendo os pares cromossômicos 4 e 12 com diagnóstico citogenético 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?).

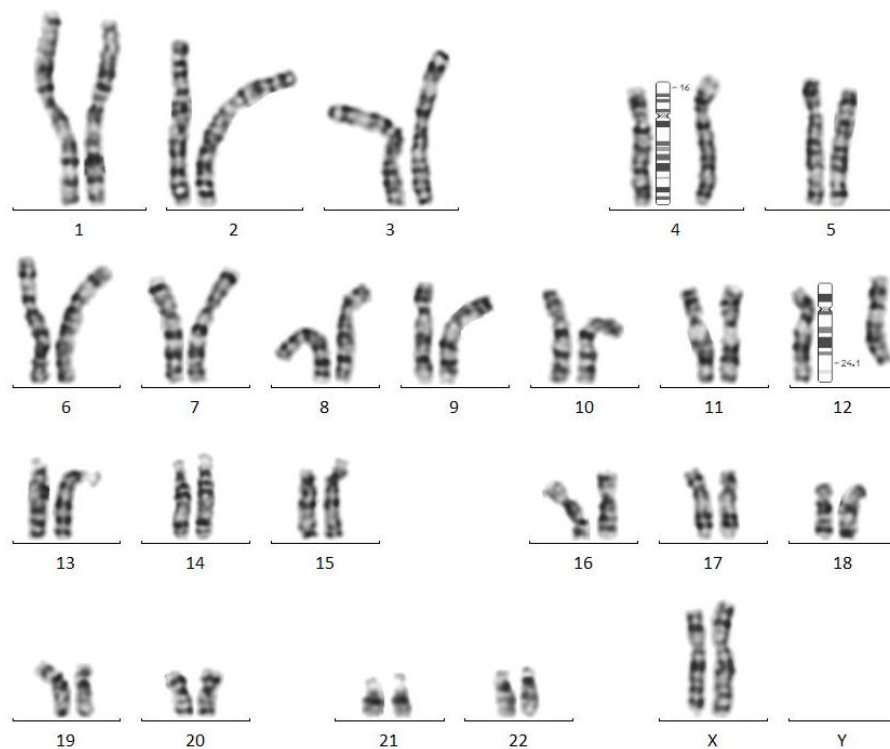


Figura 10: Cariótipo por bandamento GTG de uma das portadoras de translocação aparentemente equilibrada envolvendo os pares cromossômicos 4 e 12 com diagnóstico citogenético 46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?).

Tabela 3: Diagnóstico citogenético das pacientes P1 e P2 e dos portadores da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada, de origem familiar.

Pacientes com fenótipo alterado	Sexo	Cariótipo
P1	F	46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?)pat
P2	F	46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?)mat

Portadores do rearranjo aparentemente equilibrado	Sexo	Cariótipo
I-2	F	46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)
II-2	M	46,XY,t(4;12)(p16;q24.1?)mat
II-10	F	46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)mat
III-7	F	46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)mat

V.2 Diagnóstico Citogenético Molecular

V.2.1 Técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A investigação citogenética molecular por meio da técnica de FISH metafásico, utilizando sondas das regiões específicas 4p16.3 (marcada em vermelho) e 12q subtelomérica (12q24.33 - marcada em verde), evidenciou um único sinal vermelho localizado no braço curto do cromossomo 4 normal e três sinais verdes em ambas pacientes com fenótipo alterado. Foram detectados dois sinais verdes correspondentes ao par normal de homólogos 12 e um terceiro correspondente ao segmento do cromossomo 12 translocado para o braço curto do cromossomo 4 (ou seja no derivativo do cromossomo 4), confirmando o diagnóstico de trissomia parcial do braço longo do cromossomo 12 (12qter). A detecção de um único sinal vermelho definiu o diagnóstico de monossomia parcial do braço curto do cromossomo 4 em 4p16.3. A Figura 11 ilustra o diagnóstico citogenético molecular por meio da técnica de FISH multicolor.

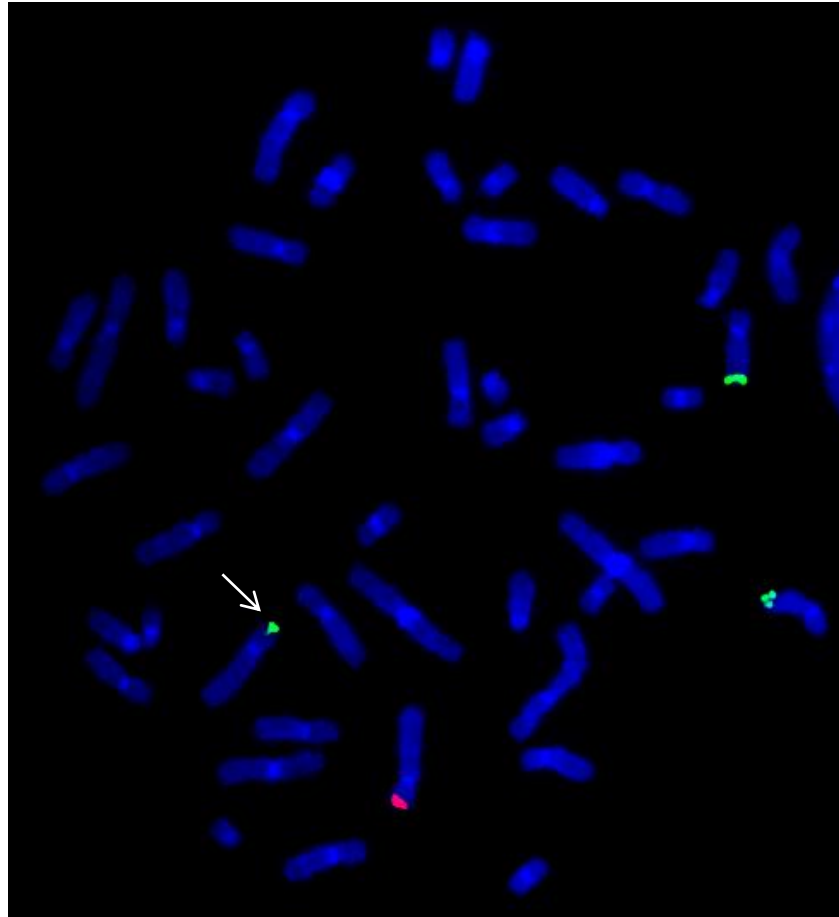


Figura 11: Metáfase de paciente P1 após aplicação da técnica de FISH, utilizando-se as sondas 4p16.3 (vermelha) e 12qter (verde), mostrando a presença de três sinais verdes e um vermelho. A seta indica a porção trissômica do cromossomo 12 localizada no derivativo do cromossomo 4. Os demais sinais verdes correspondem ao par de homólogos 12. A marcação única em vermelho corresponde ao cromossomo 4 normal. Aumento de 100X, coloração por DAPI.

Nos portadores da translocação aparentemente equilibrada, essa mesma técnica permitiu a visualização de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes, excluindo monossomias ou trissomias das regiões avaliadas (Figura 12). Foi observado que, além da marcação vermelha contida no braço curto do cromossomo 4 normal (4p), havia um outro sinal vermelho na região terminal do braço longo do cromossomo 12 translocado. O cromossomo 4 translocado, por sua vez, possuía uma marcação em verde na porção distal do braço curto, enquanto o outro sinal verde localizava-se no braço longo do cromossomo 12 normal, caracterizando assim a translocação recíproca 4p;12q.

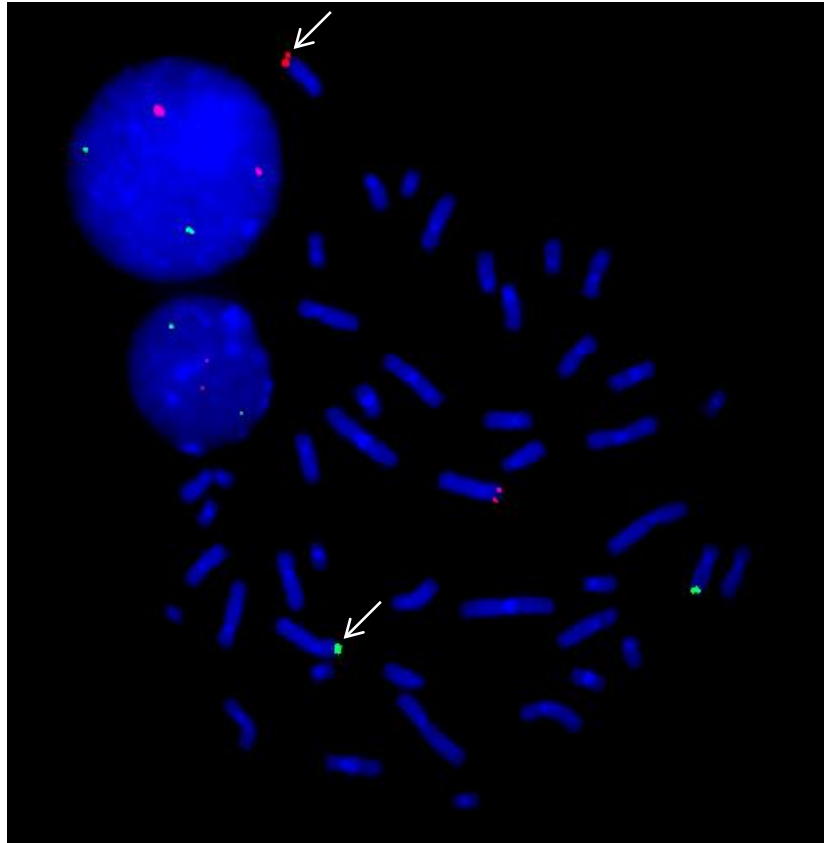


Figura 12: Célula metafásica e núcleo interfásico de portador da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada evidenciando a presença de dois sinais verdes (sonda 12qter) e dois sinais vermelhos (sonda 4p16.3), após a aplicação da técnica de FISH. A seta superior indica o cromossomo 12 translocado, no qual está inserida a porção distal do braço curto do cromossomo 4 (marcação em vermelho). A seta inferior indica o cromossomo 4 translocado, onde está inserida a porção terminal do braço longo do cromossomo 12 (marcação em verde). Os demais pontos vermelhos e verdes correspondem aos cromossomos 4 e 12 normais, respectivamente. Aumento de 65X, coloração por DAPI.

Os resultados associando as técnicas de citogenética clássica e molecular, aplicadas para o diagnóstico do rearranjo cromossômico familiar, estão listados na Tabela 4. As imagens referentes aos resultados obtidos pela técnica de FISH de todos os membros da família avaliados encontram-se no Apêndice II.

Tabela 4: Diagnóstico citogenético molecular por FISH das pacientes P1 e P2 e dos portadores da translocação 4p;12q aparentemente equilibrada.

Pacientes com fenótipo alterado	Diagnóstico Citogenético Molecular
P1	46,XX.ish der(4)t(4;12)(p16.3;q24.33)pat(D4S168-,D4S43-,D12S367+)
P2	46,XX.ish der(4)t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+)

Portadores do rearranjo aparentemente equilibrado	Diagnóstico Citogenético Molecular
I-2	46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)(D4S168-,D4S43-,D12S367+; D12S367-,D4S168+,D4S43+)
II-2	46,XY.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+; D12S367-,D4S168+,D4S43+)
II-10	46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+; D12S367-,D4S168+,D4S43+)
III-7	46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+; D12S367-,D4S168+,D4S43+)

V.3 Diagnóstico Citogenômico

V.3.1 Técnica de Híbridação Genômica Comparativa por microarranjo

A técnica de *array*-CGH permitiu a observação de perdas e ganhos em relação ao genoma referência nos seis membros analisados da família portadora da translocação 4p;12q. Dentre as alterações analisadas, além da perda e do ganho referentes aos cromossomos envolvidos na translocação, as duas pacientes afetadas, P1 e P2 partilhavam um ganho na posição genômica chr1:248,715,191-248,810,117, enquanto que a perda em homozigose da região chr1:72,766,876-72,806,287 foi comum a todos os indivíduos portadores do rearranjo aparentemente equilibrado.

Os achados citogenômicos preliminares de todos os indivíduos avaliados encontram-se no Apêndice III.

V.3.2 Investigação Citogenômica das pacientes P1 e P2

Diferentemente do observado pelas técnicas de citogenética clássica e molecular, o *array*-CGH detectou nas pacientes P1 e P2 uma diferença sutil de tamanho entre as perdas e ganhos referentes às regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo. A partir desta técnica, detectamos que P1 apresentava uma perda de 2.707.221 pb na citobanda 4p16.3, posição genômica (chr4:73,629-2,780,849) envolvendo 53 genes, além de um ganho de 12.405.205 pb em 12q24.31→q24.33, (chr12:121,446,691-133,851,895) contendo 139 genes. A paciente 2, por sua vez, apresentou uma perda de 2.710.969 pb em 4p16.3 englobando a região genômica (chr4:69,881-2,780,849) que abrange 53 genes e um ganho de 12.393.885 pb em 12q24.31→q24.33, (chr12:121,458,011-133,851,895) com 138 genes.

A análise dos genes mapeados nas regiões genômicas alteradas, feita a partir dos bancos de dados *online* (GeneCards, NCBI, OMIM e PubMed), permitiu a identificação de genes possivelmente relacionados ao fenótipo das pacientes (marcados em negrito) e de genes que apesar de não apresentarem ligação direta com a manifestação fenotípica das mesmas, são importantes reguladores de expressão gênica e do ciclo celular (sublinhados). Conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Alterações genômicas ocorridas nos cromossomos envolvidos no rearranjo não equilibrado das pacientes 1 e 2 (**P1 e P2**) diagnosticadas pela técnica de *array*-CGH, utilizando a plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA).

Pacientes	Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda cromossômica	Nº de sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
P1	chr4:73,629-2,780,849	Perda	2707221	p16.3	475	53	ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG, PDE6B, ATP5I, MYL5, MFSB7, PCGF3, LOC100129917, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFRL1, RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1-AS, CTBPI, CTBPI-AS2, MAEA, UVSSA, CRIPAK, NKX1-1, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3, FGFR3, LETMI, WHSCI, SCARNA22, MIR943, NELFA, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2
	chr12:121,446,691-133,851,895	Ganho	12405205	q24.31 - q24.33	1184	139	C12orf43, OASL, P2RX7, P2RX4, CAMKK2, ANAPC5, RNF34, MIR7107, KDM2B, ORAI1, MORN3, TMEM120B, RHOF, LINC01089, SETD1B, HPD, PSMD9, WDR66, BCL7A, MLXIP, IL31, LRRC43, B3GNT4, DIABLO, LOC101593348, VPS33A, CLIP1, CLIP1-AS1, ZCCHC8, RSRC2, KNTCL, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, MIR4304, PITPNM2, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1, MIR8072, SETD8, RILPL2, SNRNP35, RILPL1, MIR3908, LOC101927415, TMED2, DDX55, EIF2BI, GTF2H3, TCTN2, ATP6V0A2, DNAH10, CCDC92, ZNF664, ZNF664-FAM101A, FAM101A, MIR6880, NCOR2, SCARB1, UBC, MIR5188, DHX37, BRI3BP, THRIL, AACS, TMEM132B, LINC00939, LOC101927464, LOC100128554, LOC100996671, LINC00943, LINC00944, LOC440117, LOC101927592, LOC101927616, LOC101927637, FLJ37505, LINC00507, LOC100996679, LOC101927694, MIR3612, TMEM132C, SLC15A4, GLT1D1, LOC283352, LOC101927735, TMEM132D, LOC100190940, FZD10-AS1, FZD10, PIWILI, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, LINC01257, LOC338797, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, SNORA49, EP400NL, DDX51, NOC4L, GALNT9, LOC100130238, LOC101928416, FBRS1, MIR6763, LRCOL1, P2RX2, POLE, PXMP2, PGAM5, ANKLE2, GOLGA3, CHFR, LOC101928530, ZNF605, ZNF26, LOC101928597, ZNF84, ZNF140, ZNF891, ZNF10, ZNF268, ANHX
P2	chr4:69,881-2,780,849	Perda	2710969	p16.3	491	53	ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG, PDE6B, ATP5I, MYL5, MFSB7, PCGF3, LOC100129917, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFRL1, RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1-AS, CTBPI, CTBPI-AS2, MAEA, UVSSA, CRIPAK, NKX1-1, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3, FGFR3, LETMI, WHSCI, SCARNA22, MIR943, NELFA, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2
	chr12:121,458,011-133,851,895	Ganho	12393885	q24.31 - q24.33	1185	138	OASL, P2RX7, P2RX4, CAMKK2, ANAPC5, RNF34, MIR7107, KDM2B, ORAI1, MORN3, TMEM120B, RHOF, LINC01089, SETD1B, HPD, PSMD9, WDR66, BCL7A, MLXIP, IL31, LRRC43, B3GNT4, DIABLO, LOC101593348, VPS33A, CLIP1, CLIP1-AS1, ZCCHC8, RSRC2, KNTCL, HCAR2, HCAR3, HCARI, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, MIR4304, PITPNM2, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1, MIR8072, SETD8, RILPL2, SNRNP35, RILPL1, MIR3908, LOC101927415, TMED2, DDX55, EIF2BI, GTF2H3, TCTN2, ATP6V0A2, DNAH10, CCDC92, ZNF664, ZNF664-FAM101A, FAM101A, MIR6880, NCOR2, SCARB1, UBC, MIR5188, DHX37, BRI3BP, THRIL, AACS, TMEM132B, LINC00939, LOC101927464, LOC100128554, LOC100996671, LINC00943, LINC00944, LOC440117, LOC101927592, LOC101927616, LOC101927637, FLJ37505, LINC00507, LOC100996679, LOC101927694, MIR3612, TMEM132C, SLC15A4, GLT1D1, LOC283352, LOC101927735, TMEM132D, LOC100190940, FZD10-AS1, FZD10, PIWILI, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, LINC01257, LOC338797, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, SNORA49, EP400NL, DDX51, NOC4L, GALNT9, LOC100130238, LOC101928416, FBRS1, MIR6763, LRCOL1, P2RX2, POLE, PXMP2, PGAM5, ANKLE2, GOLGA3, CHFR, LOC101928530, ZNF605, ZNF26, LOC101928597, ZNF84, ZNF140, ZNF891, ZNF10, ZNF268, ANHX

Nota-se, que a perda detectada no cromossomo 4 de P2 é 3.748 pb maior que a ocorrida em P1 e que o ganho envolvendo o cromossomo 12 de P1 é 11.320 pb maior que o observado em P2. Ganho este, que abrange parte do gene *C12orf43*, incluindo os exons 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Em P2, no entanto, este gene não encontra-se duplicado, uma vez que a alteração inicia-se a partir do gene *OASL*, localizado posteriormente ao término de *C12orf43*. Em relação à caracterização gênica da deleção ocorrida em 4p16.3, não foram observadas diferenças entre as duas pacientes analisadas, ambas as alterações iniciaram-se a partir do exon 4 do gene *ZNF595* e terminaram após a deleção completa do *TNIP2*. A Figura 13 mostra de forma comparativa as perdas e ganhos genômicos ocorridos nos cromossomos 4 e 12 das duas pacientes avaliadas.

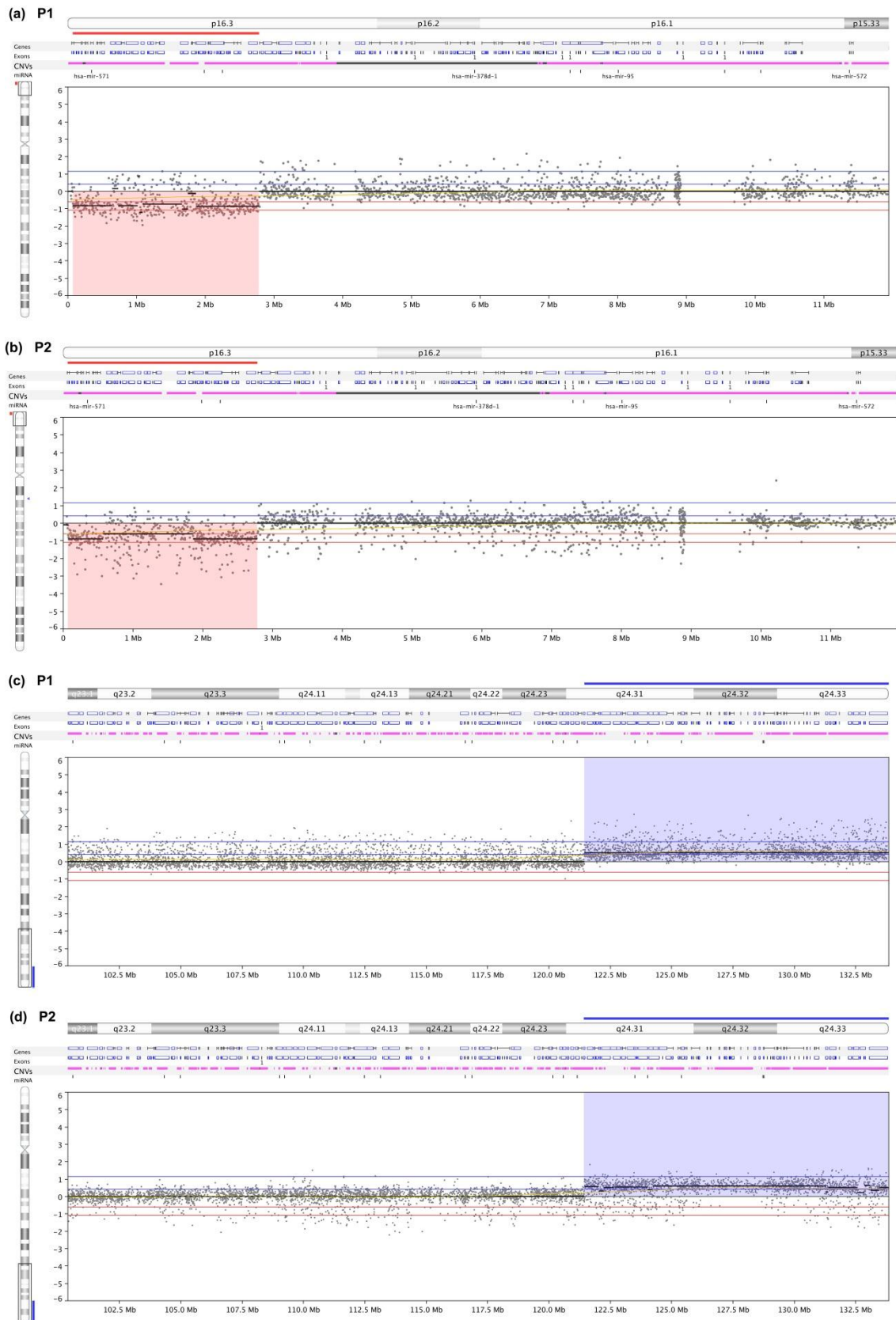


Figura 13: Imagem comparativa mostrando as perdas e ganhos observados nos cromossomos envolvidos no rearranjo cromossômico. Em (a) e (c) estão representadas as alterações observadas em P1, enquanto que as figuras (b) e (d) mostram as alterações encontradas em P2. A representação em vermelho na figura (a) esquematiza a perda de 2,7Mb ocorrida em 4p16.3, ao passo que a marcação em azul na figura (c) representa a região duplicada em 12q24.31→24.33 ambas referentes a P1. A região destacada em vermelho na figura (b)

representa a deleção de 4 observada em P2, enquanto que em (d) está em destaque o ganho de 12,4Mb ocorrido em 12q da paciente 2. Imagem obtida a partir do *Software* Nexus7.0 Biodiscovery®.

Foram também observadas nas pacientes, outras regiões de perdas e ganhos não relacionadas ao rearranjo cromossômico estrutural, consideradas pelo banco de dados DGV (*Database of Genomic Variants*) como variantes da normalidade. As alterações observadas em P1 e P2 estão representadas no Apêndice III.

V.3.3 Investigação citogenômica realizada nos portadores do rearranjo aparentemente equilibrado

Os resultados obtidos a partir da análise citogenômica de I-2, II-2, II-10 e III-7 sugeriram a presença de translocação equilibrada nesses indivíduos, visto que não foi encontrado nenhum indício de perdas e/ou ganhos genômicos nas regiões dos pontos de quebra dos cromossomos envolvidos no rearranjo, conforme mostra a Figura 14.



Figura 14: Gráfico comparativo que resume as perdas (marcadas em vermelho) e ganhos (representados em azul) genômicos detectados nos cromossomos 4 e 12 de todos os indivíduos avaliados pela técnica de *array-CGH* plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K* (Agilent®, USA). Nota-se a ausência de alterações genômicas nas regiões dos pontos de quebra cromossômica dos portadores, sugerindo a ocorrência de rearranjo equilibrado nesses indivíduos. Imagem obtida a partir do Software Nexus 7.0 Biodiscovery®

Os ganhos e perdas detectados em diferentes posições genômicas nos indivíduos portadores na análise preliminar não apresentaram associação direta com o rearranjo envolvendo as duas regiões cromossômicas 4p e 12q, podendo ser considerados polimorfismos.

A descrição dos achados observados nos indivíduos portadores assim como as tabelas demonstrando todas as alterações detectadas, as posições genômicas, as bandas citogenéticas, bem como os genes nelas inseridos constam no Apêndice III.

V.4 Diagnóstico Definitivo

Os resultados obtidos pela técnica de *array*-CGH refinaram os pontos de quebra do rearranjo cromossômico familiar, definidos em 4p16.3→4pter e 12q24.31→12qter, inicialmente identificados como 4p16 e 12q24.1 pela técnica de bandamento GTG. O diagnóstico final englobando as técnicas de citogenética clássica e citogenômica dos pacientes e demais familiares analisados estão listados na Tabela 6 e esquematizados na Figura 15.

Tabela 6: Diagnóstico definitivo dos indivíduos analisados, após aplicação das técnicas de bandamento GTG e *array*-CGH, utilizando a plataforma 2x400K (Agilent®, USA).

Indivíduos Analisados	Diagnóstico Citogenético Definitivo
P1	46,XX,der(4)(12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)pat
P2	46,XX,der(4)(12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat
I-2	46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter; 12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)
II-2	46,XY,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter; 12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat
II-10	46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter; 12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat
III-7	46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter; 12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat

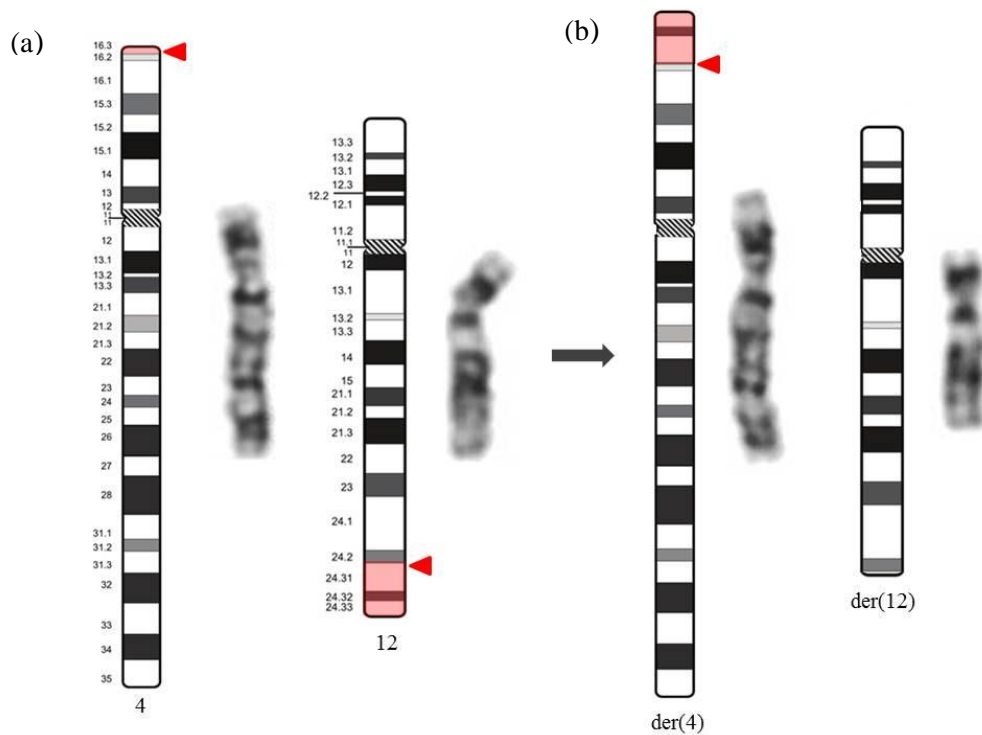


Figura 15: Esquema demonstrando os cromossomos envolvidos no rearranjo estrutural (pares 4 e 12) e seus respectivos ideogramas. Em (a) observa-se os cromossomos 4 e 12 normais, em (b) os cromossomos derivados [der (4) e der (12)]. Em (a) as marcações em vermelho destacam as regiões cromossômicas onde ocorreram as quebras e em (b) a inserção 12q em 4p. Adaptado de ISCN, 2013.

V.5 Análise de Metilação dos genes *FGFRL1* e *SPON2*

Considerando que a diferença encontrada na extensão das perdas e ganhos genômicos não foi suficiente para explicar o quadro clínico distinto observado nas duas pacientes com fenótipo alterado, e que a análise da caracterização genômica dos pontos de quebra nos cromossomos translocados envolve genes preditos como controlados por *imprinting* materno e paterno, optamos por realizar a análise de metilação dos genes *FGFRL1* (predito *imprinting* materno) e *SPON2* (predito *imprinting* paterno). A escolha desses genes baseou-se em revisão de literatura, que indicou tais genes como candidatos para explicar alguns aspectos diferenciais na expressão fenotípica das pacientes analisadas.

A análise das duas ilhas CPGs contidas na região promotora do gene *FGFRL1* não mostrou níveis de metilação significativa para as pacientes e seus genitores, quando

comparada aos controles. A média de enriquecimento de resíduos de 5-metilcitosina (5mC) na região promotora do gene em questão foi de 0.25 e 0.72 para ilha CPG 1 e 0.24; 0.25 para ilha CPG 2, em P1 e P2 respectivamente, conforme mostra a Tabela 7. Todos os valores estão abaixo do esperado para considerar a ocorrência de tal mecanismo epigenético no gene avaliado.

Tabela 7: Estudo da metilação de duas ilhas CPGs do gene *FGFRL1*. Os dados demonstram o nível de enriquecimento de 5mC em relação ao *input*.

Indivíduos analisados	Ilha CPG 1	Ilha CPG 2
P1	0,25	0,24
II-2	0,18	0,06
P2	0,72	0,25
II-10	1,44	0,7

Em relação à análise dos níveis de metilação da ilha CpG presente na região promotora do gene *SPON2*, foi verificado que o alelo não deletado, em consequência do rearranjo cromossômico não equilibrado, está metilado em ambas as pacientes avaliadas (P1 e P2). Os genitores (II-2 e II-10), portadores do rearranjo equilibrado, apresentaram 50% de metilação quando comparados com a amostra referência (*input*), podendo indicar que um dos alelos do gene *SPON2* está metilado nesses indivíduos. Tais resultados estão representados no Gráfico 1.

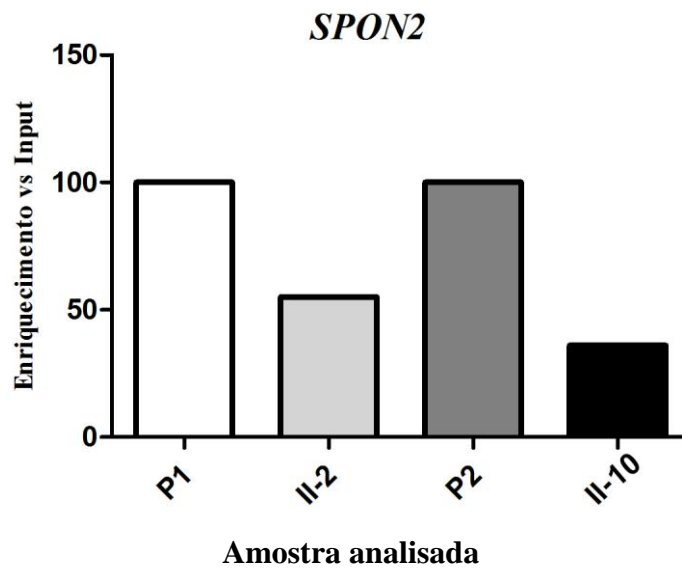


Gráfico 1: Níveis de enriquecimento de 5mC em relação ao *input* referentes ao gene *SPON2* em quatro indivíduos avaliados.

V.6 Análise de Expressão do gene *SPON2*

A análise da expressão relativa do gene *SPON2* realizada nas pacientes (P1 e P2) e seus respectivos genitores (II-2 e II-10) corroborou com os dados de metilação, mostrando que a expressão do gene está diminuída nas pacientes quando comparadas aos genitores e à amostra controle, conforme mostrado no Gráfico 2. Os valores relativos da expressão gênica em relação ao controle foram de 0,6 para P1; 1,9 para II-2; 0,3 para P2 e 1,2 para II-10.

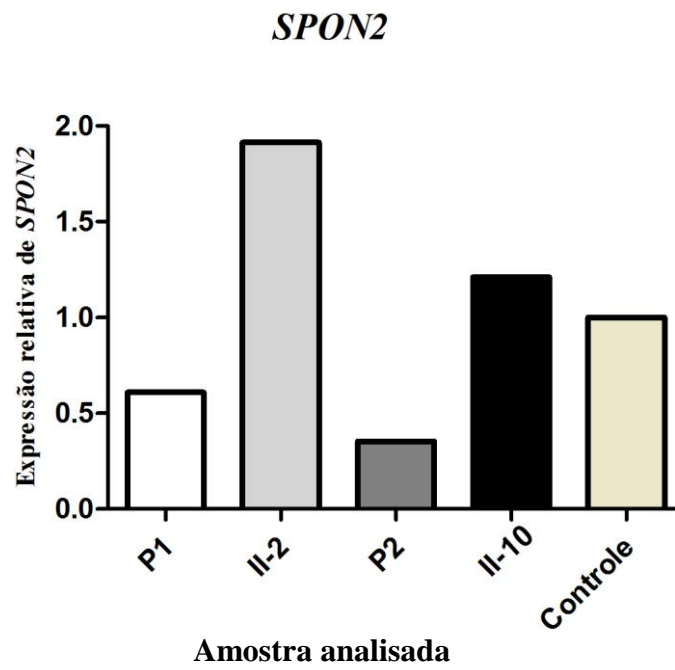


Gráfico 2: Análise da Expressão relativa do gene *SPON2* realizada nas pacientes e seus genitores, em relação à amostra controle.

Discussão

Atualmente, diferentes grupos de pesquisa buscam a elucidação dos mecanismos envolvidos na correlação genótipo-fenótipo de várias síndromes com alteração genética conhecida. No presente estudo, investigamos tal correlação avaliando uma família portadora de translocação 4p;12q. A instabilidade cromossômica gerada na transmissão do rearranjo cromossômico determinou uma monossomia parcial do braço curto do cromossomo 4 (4p) e uma trissomia parcial da porção distal do braço longo do cromossomo 12 (12q) em dois membros desta família, primas em primeiro grau, ambas apresentando anomalias congênitas múltiplas.

As regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo foram confirmadas pela técnica de FISH, que permitiu a caracterização de uma trissomia 12qter (visualizados 3 sinais específicos) e uma monossomia parcial 4p (visualizado somente um sinal específico). A investigação citogenômica, realizada por meio da técnica de *array*-CGH mapeou e refinou a localização dos pontos de quebra cromossômica envolvidos no rearranjo, definidos em 4p16.3→4pter e 12q24.31→12qter.

A plataforma escolhida para este fim foi a *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K da Agilent® (USA), selecionada a partir de relatos da literatura nos quais os autores compararam a performance de diferentes plataformas de *array*-CGH, com resoluções teoricamente semelhantes, classificando a plataforma da empresa Agilent® como sendo de boa performance, ao lado de outras, porém destacando-se por possuir um pacote de *software* preciso, fácil de ser utilizado (ZHANG et al., 2008; MASON-SUARES et al., 2013). Nós optamos por não utilizar o *software* de análise da mesma empresa, devido à experiência de nosso grupo com o *software Nexus Copy Number* e pela sua integração com vários bancos de dados externos, que permite uma análise ampla e detalhada das alterações genômicas detectadas.

De acordo com a literatura, a trissomia parcial 12q diagnosticada nas pacientes da família avaliada neste projeto, é uma alteração cromossômica considerada rara, tendo sido relatados até o momento apenas 26 pacientes que apresentam um amplo espectro fenotípico. Figuram entre os achados mais comuns a deficiência intelectual, o atraso de desenvolvimento e linguagem, anomalias cerebrais congênitas, doenças cardíacas e urogenitais, além de dismorfias como hipertelorismo ocular, ponte nasal plana, orelhas baixo implantadas e pouco lobuladas, rima labial voltada para baixo, macrostomia, micrognatia, hipertelorismo mamilar, prega de transição palmar, clinodactilia, fosseta sacral e deformidades dos membros inferiores (TAJARA et al., 1985; BAO & SCHORRY 2005; VAGLIO et al., 2007; SHCHELOCHKOV et al., 2008; BOUMAN et al., 2013).

Na maioria dos casos relatados, tal alteração resulta de um erro durante a segregação meiótica do tipo adjacente I, herdada de um dos genitores a partir de uma translocação equilibrada, com perda de material genético de outro cromossomo. Comumente, a variabilidade do fenótipo observado depende do tipo e da extensão da monossomia parcial associada ao rearranjo (BAO & SCHORRY 2005; BENUSSI et al., 2009).

A menor duplicação do cromossomo 12 já relatada, envolve a região 12q24.21→q24.23 que compreende 2,3 Mb. Esta alteração *de novo* foi detectada em uma paciente que apresentava deficiência intelectual grave e crescimento severamente prejudicado, além de dismorfias craniofaciais. Embora este seja o menor segmento adicional já descrito, esta região parece ser crítica para o desenvolvimento do fenótipo observado, englobando 16 importantes genes relacionados ao quadro clínico das portadoras (RUITER et al., 2006).

Bouman e colaboradores (2013) descreveram o caso de um adolescente portador de trissomia parcial 12q devido a uma inserção equilibrada de origem materna no cromossomo 16, com diagnóstico citogenético 46,XY,der(16)dir ins(16;12)(q12.1;q24.11q24.31). O quadro clínico do paciente era bastante similar aos demais já descritos na literatura e ao das pacientes

analisadas neste estudo, incluindo deficiência intelectual grave, atraso de crescimento, alterações comportamentais, hipertonia, microcefalia, sobrelhas arqueadas, hipertelorismo ocular, epicanto, ponte nasal alargada, baixa implantação das orelhas, macrostomia com rima labial voltada para baixo, retrognatia, pescoço curto, hipertelorismo mamilar, fosseta sacral e pés valgos. A análise do SNP *microarray* desse paciente demonstrou um ganho da região 12q23.3q24.31 de 16,3 Mb que incluía 250 genes, dos quais 126 estão listados no OMIM. Devido à extensão da alteração, foi inviável um delineamento entre o fenótipo e o genótipo do paciente, pois a região incluía muitos genes de interesse associados a diferentes síndromes genéticas. Os autores sugeriram que a atuação sinérgica dos genes contidos dentro da região alterada poderia ter contribuído para o fenótipo do paciente, contudo foi uma análise empírica, sendo necessários estudos mais específicos para um melhor delineamento fenotípico.

Bao & Schorry (2005) também relataram um caso cujo segmento adicional da porção distal do cromossomo 12 (12q24.31→qter) estava inserido no cromossomo 16 devido a uma translocação não equilibrada em pai e filha, sendo que ambos apresentavam o mesmo diagnóstico citogenético der(16)t(12;16)(q24.31;q24.3) e alterações fenotípicas semelhantes.

Ireland e colaboradores (2004) relataram um paciente portador da duplicação 12q24.31→qter com inserção na porção distal do braço curto do cromossomo 5. Seu fenótipo incluía deficiência intelectual e atraso de desenvolvimento leves, escoliose, achatamento dos ossos da face, epicanto, estrabismo, discreta retrognatia e fosseta sacral. A análise cromossômica dos pais revelou ser esta uma alteração *de novo*. O diagnóstico confirmado por FISH não mostrou perdas adicionais em 5p. Os autores sugeriram que as alterações fenotípicas discretas poderiam ser explicadas pela ausência de perdas adicionais no cromossomo 5 ou mesmo pelo tamanho e localização terminal da trissomia.

Embora cromossomos derivativos sejam comumente descritos como decorrentes de erros meióticos em portadores de translocações equilibradas, Lagier-Tourenne e

colaboradores (2004) relataram o caso de dois primos com trissomia parcial 12q24.3→qter e monossomia 12p13→pter gerada por inversão pericêntrica familiar do cromossomo 12. Vaglio e colaboradores (2007) também descreveram um caso de alteração cromossômica semelhante, com uma deleção de 6,7 Mb em 12pter→12p13.31 além de uma duplicação de 19,8 Mb englobando as bandas 12qter→12q24.13. As características fenotípicas incluíam dismorfias craniofaciais, pés valgos, ataxia cerebelar, cardiopatia, hipoplasia genital e fosseta sacral. Segundo Lagier-Tourenne e colaboradores (2004), famílias portadoras de inversões pericêntricas podem apresentar risco elevado de rearranjos não equilibrados em decorrência de crossing-over meiótico dentro da área invertida, ao passo que o aumento do risco de alterações cromossômicas adicionais está provavelmente associado ao efeito intercromossômico.

Assim como em três dos trabalhos acima descritos (IRELAND et al., 2004; LAGIER-TOURENNE et al., 2004; BAO & SCHORRY 2005), o ponto de quebra em 12q das duas pacientes analisadas neste estudo ocorreu na banda 12q24.3→qter. A caracterização genômica do ganho que se estendeu por aproximadamente 12,4 Mb em ambas as pacientes analisadas, engloba um número distinto de genes em cada uma delas. Em P1 o ganho abrangeu 139 genes, ao passo que em P2 essa mesma alteração incluiu 138 genes. Tal diferença deve-se ao tamanho da alteração que é 11,3 Kb maior em P1, estendendo-se aos exons 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do gene *C12orf43*, ainda pouco estudado. Sabe-se, no entanto, que ele é altamente conservado e codificador de uma proteína não caracterizada (#Q96C57-CL043_HUMAN). A busca desse termo no PubMed resultou em apenas um trabalho publicado em 2009, no qual os autores sugeriram que o *locus* em 12q24.31 incluindo os genes *HNF1A-C12orf43* estava relacionado com o aumento da susceptibilidade a doenças coronárias, como a aterosclerose (ERDMANN et al., 2009). O seguimento médico e exames

recentes realizados em P1 não sugerem, até o momento, alterações que levem ao desenvolvimento de doenças cardíacas, além da ausculta já relatada.

A alteração em 12q das duas pacientes inclui sete genes descritos no OMIM: *ORAI1*, *HPD*, *BCL7A*, *EIF2B1*, *ATP6V0A2*, *PUS1* e *DIABLO*. Segundo a análise feita a partir desse banco de dados, alterações na estrutura ou atividade das proteínas traduzidas pelos genes *HPD* e *ATP6V0A2* podem resultar em características fenotípicas descritas nas duas pacientes, como por exemplo, deficiência intelectual e convulsões, além de atraso de crescimento e desenvolvimento associados a anormalidades esqueléticas (TOMOEDA et al., 2000; GARDEITCHIK et al., 2014).

Segundo Cheng e colaboradores (2011) e Luo e colaboradores (2013), mutações no gene *DIABLO* também localizado na região duplicada, estão relacionadas com o desenvolvimento de perda auditiva. No entanto, não podemos afirmar por meio dos testes realizados, se essas tais mutações ocorreram e se podem ser a causa da perda auditiva apresentada pelas pacientes da amostra. A revisão dos demais genes mapeados na região duplicada em 12q não auxiliaram a correlação genótipo-fenótipo.

Além da trissomia parcial 12q, as pacientes analisadas neste estudo apresentavam, devido à translocação equilibrada transmitida por um dos genitores, uma monossomia parcial 4p. A associação das duas alterações cromossômicas foi relatada até o momento em apenas três casos (MELNYK et al., 1981; TAJARA et al., 1985; WILSON & OEI, 1998).

Deleções parciais no braço curto do cromossomo 4 resultam na síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH) OMIM (#194190). Primeiramente descrita por Cooper e Hirschhorn em 1961, caracteriza-se por ser uma síndrome de genes contíguos que afeta 1 em cada 50.000 nascimentos. O seguimento mínimo deletado para a ocorrência do fenótipo deve conter total ou parcialmente, a banda 4p16.3 (BATAGLIA et al., 2008).

Os pacientes afetados apresentam além da deficiência mental, um grave atraso de desenvolvimento, tanto intrauterino como pós-natal, hipotonia, microcefalia e alterações faciais típicas. A mais característica é representada pela ponte nasal alargada em continuidade com o frontal, que lembra um capacete de guerreiro grego (BAYINDIR et al., 2013).

Mais de 80% dos afetados apresentam orelhas baixas implantadas, pouco lobuladas ou rodadas posteriormente, com ou sem a presença de apêndices. Fenda de palato uni ou bilateral é descrita em 1/3 dos pacientes com deleções maiores que 3,5 Mb. Quarenta por cento dos casos apresentam alguma alteração de nervo óptico e pelo menos metade deles ptose palpebral. Além disso, uma grande variedade de alterações esqueléticas, anormalidade no desenvolvimento dos dentes e da genitália, incluindo criptorquidia nos homens, gônadas em fita e ausência de útero nas mulheres e defeitos cardíacos caracterizados pelo não fechamento de septo atrial ou ventricular são recorrentes. Convulsões tendem a ocorrer em 90% dos pacientes portadores de tal alteração. Segundo Bataglia e colaboradores (2015), a variabilidade fenotípica observada entre os portadores da deleção 4p depende do local, terminal ou intersticial da mesma, e também de sua extensão e origem, se *de novo* ou herdada a partir de um rearranjo equilibrado.

Na maioria dos casos, aproximadamente 55% deles, a deleção ocorre sem que haja envolvimento de outra alteração cromossômica. Entretanto, já foram descritos casos dessa síndrome devido a aberrações mais complexas como a formação de cromossomos em anel ou cromossomos derivativos, gerados a partir de uma translocação equilibrada herdada. Nos casos em que existe uma translocação familiar, há uma proporção de 2:1 das deleções 4p serem de origem materna (SOUTH et al., 2008; ZOLLINO et al., 2008).

Quando esta condição está associada à trissomia parcial 12q, como a que ocorre em nossa amostra, os principais fenótipos encontrados são: atraso de crescimento intrauterino e pós natal, dismorfias craniofaciais, clinodactilia, pés valgus e fosseta sacral. Doenças

cardíacas, respiratórias e renais também foram descritas, além de anormalidades no sistema genital, convulsões e otites recorrentes. Um quadro comparativo entre os achados fenotípicos descritos na literatura em casos de translocação 4p;12q e os achados clínicos descritos em nosso estudo está representado na Tabela 8.

Wilson & Oei (1998) descreveram o caso de uma família portadora da translocação equilibrada $t(4;12)(p15.2;q21.3)$. O rearranjo familiar foi detectado devido ao nascimento de uma menina portadora de rearranjo não equilibrado, cariótipo $46,XX,der(4)t(4;12)(p15.2;q21.3)mat$ que apresentava face triangular, frontal amplo, ponte nasal alargada, hipertelorismo, retrognatia, fenda de palato, orelha rodada posteriormente, metacarpos anormais e sindactilia do 1º e 2º pododáctilos. Hipoplasia renal bilateral e útero unicorno também foram descritos. A investigação subsequente da família revelou seis portadores do mesmo rearranjo equilibrado (dois homens e quatro mulheres) e três abortamentos.

Outros dois casos de portadores do mesmo rearranjo e características físicas semelhantes foram descritos por Melnyk e colaboradores (1981) e Tajara e colaboradores (1985), os quais diferiam apenas pelo ponto de quebra no cromossomo 12, detectados em q24.1 e q24.31, respectivamente. Além das dismorfias faciais, o paciente descrito por Melnyk e colaboradores apresentava grave doença respiratória, atrofia cerebelar, convulsões, cardiomegalia, edema pulmonar, ausência do rim direito, espinha bífida e alterações no sistema genital. Os autores sugeriram que as variações encontradas entre os quadros clínicos dos pacientes eram consequência dos diferentes pontos de quebra, resultando em diferentes duplicações e deleções.

Tabela 8: Sinais clínicos avaliados nas pacientes descritas nesse estudo em comparação com os dados da literatura dada a ocorrência de rearranjo cromossômico semelhante, t(4p;12q).

Características Fenotípicas	Wilson & Oei, 1998	Tajara et al., 1985	Melnyk et al., 1981	P1	P2
Deficiência mental	+	+	+	+	+
Distúrbio comportamental				+	+
Convulsões			+		+
Microcefalia				+	+
Dolicocefalia		+			
Frontal amplo	+	+		+	+
Baixa implantação capilar anterior				+	
Face triangular	+			+	
Hipoplasia de face média					+
Orelha baixo implantada e rodada posteriormente	+	+	+		+
Microtia à direita					+
Orelha em concha à esquerda				+	+
Apêndice pré-auricular					+
Perda auditiva				+	+
Rarefação do terço distal da sobrancelha				+	+
Proptose					+
Astigmatismo				+	
Epicanto			+		
Hipertelorismo	+	+	+		
Telecanto					+
Fenda palpebral oblíqua para cima		+		+	
Ptose de pálpebras				+	
Estrabismo de olho direito		+	+	+	
Raiz nasal alta				+	+
Ponte nasal alargada	+	+	+	+	+
Nariz em bico		+			+
Hipoplasia de aleta nasal			+		+
Macrostomia					+
Microretrognatia	+	+	+	+	+
Rima labial voltada para baixo		+	+		
Oligodontia				+	
Palato alto		+			
Fenda palato duro	+			+	
Clinodactilia		+		+	
Prega de transição palmar		+	+		
Pés planos e valgos		+	+	+	+
Sindactilia do 1º e 2º pododáctilos e ausência do terceiro à esquerda	+				

Frouxidão articular	+		+	+
Escoliose	+		+	+
Hipotrofia muscular	+	+	+	+
Sopro cardíaco		+	+	
Fosseta sacral	+	+	+	+

*Os achados foram registrados de acordo com as informações contidas nas publicações originais.

Como já relatado, o tamanho da deleção ocorrida em 4p é um dos fatores que promove a variabilidade fenotípica entre os pacientes portadores dessa alteração. A análise comparativa entre as perdas ocorridas em 4p16.3 nas pacientes deste estudo revelou que P2 possuía uma deleção de aproximadamente 3,7 Kb maior do que a perda observada em P1. Assim, os resultados sugeriram correlação entre maior extensão da perda genômica (monossomia) e a severidade do quadro clínico, sendo que P2 apresenta fenótipo mais alterado.

Quanto ao mapeamento gênico da alteração descrita, observamos que ambas as pacientes apresentavam uma perda de aproximadamente 2,7 Mb na qual 53 genes foram deletados, incluindo três dos principais genes relacionados ao fenótipo característico da SWH: *WHSC1*, *LETMI* e *NELFA*, também conhecido como *WHSC2* (BAYINDIR, et al., 2013).

O gene *WHSC1* do inglês (“Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1”), também conhecido como *MMSET*, é considerado um dos principais para o surgimento do quadro clínico da SWH e está relacionado com a formação de pelo menos três proteínas semelhantes MMSET I, MMSETII e RE-IIBP. Essas proteínas são ativadas tanto antes, quanto após o nascimento, em muitas células e tecidos do corpo, assumindo papel importante para o desenvolvimento normal. Acredita-se que a perda desse gene, provavelmente interrompa a regulação de vários outros ainda não identificados, contribuindo para muitos dos achados característicos da doença, como deficiência intelectual, atraso de crescimento e dismorfias faciais (BERGEMANN et al., 2005; SOUTH et al., 2007; GENETICS HOME REFERENCE, 2015). Já o gene *WHSC2* pode estar envolvido com os aspectos mais globais da síndrome,

uma vez que desempenha papel importante no processamento do RNAm e nas atividades do ciclo celular (KERZENDORFER et al., 2012).

Desvendar a causa para a ocorrência de convulsões parece ser o maior desafio encontrado em pacientes portadores da deleção 4p16.3. Por algum tempo acreditou-se que a perda do gene *LETMI* estivesse relacionada com o surgimento de tal fenótipo, uma vez que ele exerce função na troca de íons CA^{2+} , importantes para sinalização e produção de energia celular (ENDELE et al., 1999). No entanto, Andersen e colaboradores (2014) descreveram três pacientes portadores de uma deleção de 400 Kb em 4p16.3 a qual englobava os genes *WHSC1* e *LETMI*, com várias características clínicas da SWH, mas sem histórico de convulsões. Relatos de casos com e sem o desenvolvimento de convulsões incluindo a deleção de *LETMI* afastaram a possibilidade deste ser o único gene responsável pelo aparecimento de tal comorbidade (BAYINDIR et al., 2013; ANDERSEN et al., 2014). Shimizu e colaboradores (2013) e Zollino e colaboradores (2014) sugeriram que o aparecimento de convulsões esteja relacionado com deleções mais terminais em 4p, englobando outros genes, que não apenas *LETMI*. Figuram entre os genes candidatos já descritos na literatura *CTBP1*, *PIGG* e *CPLX1*, todos envolvidos com a atividade sináptica dos neurônios (MISCEO et al., 2012; BAYINDIR et al., 2013; ZOLLINO et al., 2014; SHIMIZU et al., 2013; IVANOVA et al., 2015).

Considerando que as deleções terminais em 4p detectadas neste estudo são semelhantes e englobam todos os genes candidatos para o aparecimento de convulsões, e que este fenótipo foi observado em apenas uma das pacientes analisadas, é possível que outros genes ou outros mecanismos estejam relacionados com o desenvolvimento de tal fenótipo.

A revisão nos bancos de dados *online* dos demais genes deletados em 4p16.3, por consequência do rearranjo familiar não equilibrado, revelou outros dois genes que podem

estar relacionados ao quadro clínico das pacientes. São eles: *SPON2* (“Spondin 2, Extracellular Matrix Protein”) e *FGFRL1* (“Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1”).

O gene *SPON2* é codificador da proteína “Spondin 2”, que caracteriza-se por ser uma proteína de matriz extracelular, com propriedades adesivas e importante papel no desenvolvimento embrionário, especificamente no crescimento do hipocampo, na formação das conexões neurais e no controle da cito-arquitetura do sistema nervoso central (KIM et al., 2012).

Estudos realizados em camundongos demonstraram que durante os primeiros estágios do desenvolvimento, o gene *SPON2* apresenta-se altamente expresso no mesencéfalo, diencéfalo e cerebelo, alcançando o bulbo olfatório e o córtex à medida em que avançam as etapas do desenvolvimento. Logo após o nascimento, a proteína transcrita a partir desse gene persiste em várias camadas do neocortex. Na idade adulta sua expressão é basal, mas ainda detectável nos giros neocorticais e no hipocampo (FEINSTEIN et al., 1999).

O gene *FGFRL1*, por sua vez, é codificador de uma proteína membro da família “fibroblast growth factor receptor (FGFR)”, a qual é responsável por regular uma variada gama de funções celulares como proliferação, adesão, diferenciação, migração e apoptose (TRUEB & TAESCHLER, 2006; MARTINO et al., 2013). Segundo Matoso e colaboradores (2014), a expressão de *FGFRL1* ocorre preferencialmente nos tecidos cartilaginoso e ósseo primordial como maxilar, mandíbula, costelas e nariz. Os músculos da língua e do diafragma também demonstram alta expressão desse gene, enquanto que coração, aorta, músculos esqueléticos, cérebro, pulmão, fígado, rim e intestino exibem expressão moderada.

A literatura sugere que tal gene também esteja associado com fenótipo da SWH, apresentando-se como candidato para o aparecimento de algumas das características faciais, o atraso de crescimento intrauterino e a baixa estatura em portadores da deleção 4p (CATELA et al., 2009; ENGBERS et al., 2009; TRUEB, 2011; HAMMOND et al., 2012; SHIMIZU et

al., 2013). Ao promover o desligamento desse gene em camundongos, Catela e colaboradores (2009) observaram alterações ósseas típicas da SWH, como o encurtamento do esqueleto axial e apendicular e malformação das vértebras. Em humanos, mutações no gene *FGFRL1* também foram associadas ao surgimento de cranioestenose e condrodisplasias (WILKIE, 2005).

Embora vários genes situados em 4p16.3 sejam candidatos para a expressão fenotípica observada em pacientes portadores da SWH, há evidências de que o núcleo fenotípico desta síndrome, que em vários pontos se assemelha ao quadro clínico descrito em nossa amostra, esteja associado à haploinsuficiência de genes contíguos, o que dificulta o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo precisa em pacientes portadores de deleção 4p (ZOLLINO et al., 2014).

Além do fator acima descrito, acreditamos que no caso das pacientes analisadas neste estudo, o mecanismo de *imprinting* poderia estar contribuindo para a diferença fenotípica observada entre as mesmas. *Imprinting* genômico caracteriza-se por ser um fenômeno epigenético que promove a expressão alelo específica de certos genes, de acordo com sua origem parental. Este está intimamente relacionado com a regulação do crescimento embrionário, funções placentárias e processos neurocomportamentais (JOHN & LEFEBVRE, 2011; CHIBA et al., 2013).

Um evento chave para que o *imprinting* se estabeleça é a metilação do DNA. Vista como um mecanismo epigenético vital para o desenvolvimento dos mamíferos, a metilação desempenha não apenas papel importante na regulação de genes controlados por *imprinting*, mas também uma grande variedade de processos celulares, incluindo o controle da expressão gênica, a manutenção da estabilidade do genoma e a compensação de dose do cromossomo X. Quando ocorre em regiões promotoras, pode reprimir a expressão gênica impedindo a ligação de fatores de transcrição específicos ou atrair mediadores de remodelação da cromatina, tais

como enzimas modificadoras de histonas ou qualquer outro repressor da expressão gênica (MONK, 2015).

Nos mamíferos, a metilação mitoticamente herdada é assegurada pela enzima DNA metiltransferase (DNMT1), enquanto que as enzimas DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação *de novo* que ocorre em sítios ainda não metilados (DUPONT et al., 2009). Vários estudos mostraram que DNMT3A e DNMT3B marcam diferentes sítios de metilação, dependendo do tipo celular e do estágio do desenvolvimento (OKANO et al., 1999; KANEDA et al., 2004; DODGE et al., 2005).

Devido à possível correlação entre os dois genes acima descritos (*SPON2* e *FGFRL1*), os aspectos fenotípicos observados nas pacientes e o fato destes serem genes preditos como controlados por *imprinting* paterno e materno respectivamente (GENE IMPRINTING, 2015), consideramos que o estudo dos níveis de metilação pudesse esclarecer algumas diferenças fenotípicas observadas entre P1 e P2.

O gene *FGFRL1* é importante para a formação dos ossos da maxila e mandíbula, e experimentos em modelo animal sugerem que seu desligamento esteja associado a defeitos na formação dos septos coronários (CATELA et al., 2009). Avaliamos os níveis de metilação desse gene buscando encontrar evidências de que o *imprinting* materno predito para o mesmo estivesse relacionado aos achados fenotípicos como fenda palatina e alteração de septo interatrial, descritos apenas em P1. No entanto, esta análise não foi informativa e não revelou níveis significativos de metilação na região promotora do gene nos indivíduos avaliados.

Os níveis de metilação na região promotora do gene *SPON2*, bem como sua expressão relativa, também foram avaliados. Por se tratar de um gene funcionalmente importante para o desenvolvimento neuronal, diferenças nos padrões de metilação e expressão gênica em virtude do *imprinting* paterno predito para este gene, poderiam justificar o comprometimento intelectual diferente observados nas duas pacientes.

Assim como descrito por Kim e colaboradores (2012), que encontraram altos níveis de metilação para *SPON2* em amostras não tumorais quando comparadas com linhagens de câncer de próstata, verificamos que este gene também se encontra metilado nas pacientes deste estudo. Os resultados, contudo não foram informativos e diferiram do esperado, uma vez que os níveis de metilação avaliados foram semelhantes em ambas as pacientes, independentemente do genitor que transmitiu a alteração cromossômica. Segundo Smith e colaboradores (2012), casos de translocações ou inversões envolvendo genes controlados por *imprinting* podem provocar alterações no padrão de metilação do DNA devido a modificações na estrutura da cromatina.

A análise de expressão do gene do gene *SPON2* corroborou com os dados de metilação já descritos, uma vez que as pacientes 1 e 2 demonstraram ter baixos níveis de expressão relativa quando comparadas aos genitores e à amostra controle. Variações no padrão de expressão gênica podem ser explicadas devido ao fato de genes controlados por *imprinting* serem, normalmente, sensíveis à dosagem e expressos a partir de um único alelo. Sendo assim, qualquer alteração no alelo ativo poderia causar modificações na produção de transcritos, alterando o padrão de expressão desse gene. Outros fatores como modificadores de histonas, RNAs não codificadores e o efeito de posição, gerado em consequência de rearranjos cromossômicos estruturais, como o descrito neste trabalho, podem também ocasionar diferenças no padrão de expressão gênica (SMITH et al., 2012).

Diante dos resultados, não podemos afirmar que uma provável repressão da expressão gênica devido ao *imprinting* materno e paterno predito para os genes *FGFRL1* e *SPON2* respectivamente, esteja associada às características fenotípicas distintas observadas nas pacientes. A expressão relativamente menor de *SPON2* verificada em P2 poderia estar relacionada ao desempenho intelectual mais severamente comprometido, quando comparadas as duas pacientes.

Consideramos ainda, que a avaliação da metilação genômica global e não apenas gene específica, poderia trazer maiores esclarecimentos, posto que alterações nos padrões de metilação do DNA podem ser detectadas a longas distâncias no genoma de pacientes portadores de rearranjos cromossômicos estruturais, influenciando a expressão de genes funcionalmente importantes para o fenótipo desses pacientes.

Além dos ganhos e perdas gerados pelo rearranjo cromossômico familiar, as pacientes deste estudo apresentaram variações genômicas estruturais menores, não relacionadas ao fenótipo observado, conhecidas como variações no número de cópias (CNVs). CNVs são alterações genômicas submicroscópicas maiores que 1 Kb que alteram o estado diploide de parte do genoma, seja por duplicações ou deleções. Estas podem ser consideradas patogênicas ou não, dependendo da extensão e local em que se estabelecem no genoma. As CNVs patogênicas geralmente modificam a dosagem dos genes, provocam a interrupção de regiões codificadoras ou fusão gênica resultando na formação de uma nova proteína (BASIT et al., 2015).

A interpretação das consequências genótípicas e fenotípicas causadas pelas CNVs é essencial para o entendimento da etiologia genética de muitas doenças como transtornos do espectro autista (TEA), doenças psiquiátricas, deficiência intelectual e outras disfunções do desenvolvimento neurológico. Análise citogenômica desse grupo de pacientes revelou que aproximadamente 10 a 15% das crianças encaminhadas para esse tipo de análise, possuíam deleções ou duplicações raras, relacionadas ao fenótipo (NEILL et al., 2010). Contudo, a patogenicidade da maioria das CNVs ainda permanece desconhecida, tornando-se um desafio para os pesquisadores (NEWMAN et al., 2015).

Com o surgimento de novas plataformas de análise genômica, como *array*-CGH, *SNP-array* e o sequenciamento de nova geração (NGS), um número cada vez maior de CNVs tem sido identificado, culminando na criação de bancos de dados que contém tais variantes,

quer sejam benignas ou patogênicas (WECKSELBLATT & RUDD, 2015). O banco de dados DGV (*Database of Genomic Variants*) foi criado em 2004 como um catálogo constantemente atualizado de CNVs descritas em indivíduos controles de todo o mundo, compreendendo informações de mais de 55 trabalhos abrangendo um total de aproximadamente 2,3 milhões de CNVs benignas descritas em todos os cromossomos (MACDONALD et al., 2013; ZARREI et al., 2015).

A partir dessas informações, Zarrei e colaboradores (2015) propuseram um mapa de CNVs benignas contidas no genoma humano, a fim de documentar a extensão e as características de tais alterações. Os autores concluíram que os cromossomos mais propensos a apresentarem variações de perdas e ganhos em sua estrutura são os pares 19, 22 e Y, enquanto que os pares 5 e 18 são os menos alterados. Uma maior proporção de CNVs foi identificada nas regiões pericentroméricas e subteloméricas quando comparados todos os cromossomos.

Assim como o observado por Zarrei e colaboradores (2015), tanto as pacientes, quanto os portadores da translocação equilibrada analisados em nosso projeto apresentaram um maior número de variações nas regiões próximas aos centrômeros e telômeros. Nenhuma alteração no número de cópias foi observada no cromossomo 18 e apenas um portador do rearranjo equilibrado (II-2) apresentou um ganho de 65,8 Kb no cromossomo 5, além de todos os indivíduos apresentarem variações de ganho e perda no braço longo do cromossomo 22, todas classificadas como não patogênicas.

Enfatizamos que os resultados deste estudo não evidenciaram perdas e/ou ganhos genômicos nas regiões dos pontos de quebra cromossômica ocorridos nos portadores do rearranjo estrutural equilibrado. De acordo com a análise realizada a partir do banco de dados DGV, todas as alterações encontradas nos portadores da translocação equilibrada (4p;12q) se sobrepõe a regiões de CNVs não patogênicas, consideradas como variantes da normalidade.

A associação das técnicas de citogenética clássica, citogenética molecular e citogenômica dos membros da família investigada, portadora de rearranjo estrutural 4p;12q foi decisiva para a definição do diagnóstico clínico e do diagnóstico etiológico das pacientes, resultando na determinação do risco de recorrência para os portadores e consequente aconselhamento adequado para a família.

Conclusões

- A utilização das técnicas de citogenética clássica (cariótipo por bandamento GTG), associada à citogenética molecular (FISH) e à citogenômica (*array*-CGH) permitiu o diagnóstico preciso do rearranjo cromossômico estrutural familiar envolvendo o braço curto do cromossomo 4 e o braço longo do cromossomo 12.
- A investigação realizada possibilitou a determinação do diagnóstico citogenético definitivo das pacientes e de seus familiares, direcionando o aconselhamento genético de três gerações dessa família.
- O estudo citogenômico pela técnica de *array*-CGH dos portadores de rearranjo estrutural 4p;12q permitiu o refinamento e localização precisa dos pontos de quebra cromossômica, assim como a determinação das regiões de perdas e ganhos genômicos em 4p16.3 e 12q24.31-q24.33, detectados nas pacientes com fenótipo anormal e rearranjo estrutural não equilibrado.
- A caracterização genômica permitiu a definição do diagnóstico clínico definitivo de monossomia 4p16 e trissomia parcial 12qter nas pacientes com rearranjo estrutural não equilibrado.
- Foram detectadas diferentes alterações genômicas nas duas pacientes, sendo a perda ocorrida em 4p16.3 de uma das pacientes (P2) 3,7 Kb maior que a perda ocorrida na mesma região em P1 e um ganho 11,3 Kb maior em P1 envolvendo a região 12q24.31-24.33. Os resultados corroboram os efeitos da dosagem gênica descritos na literatura, que descreve maior comprometimento fenotípico nas monossomias, quando comparado às trissomias.
- A análise citogenômica das regiões correspondentes aos pontos de quebra cromossômica nos quatro indivíduos portadores de translocação 4p;12q aparentemente equilibrada mostrou ausência de perda ou ganho de material genômico nessas regiões, indicando que a translocação 4p;12q seja um rearranjo equilibrado.

➤ A caracterização genômica do rearranjo revelou a deleção de genes funcionalmente importantes que sugerem ter correlação com o fenótipo apresentado pelas pacientes, dentre eles *WHSC1*, *NELFA*, *FGFRL1* e *SPON2*.

➤ Os resultados da investigação do padrão de metilação dos genes *FGFRL1* e *SPON2* não permitiram afirmar que uma provável repressão da expressão gênica devido ao *imprinting* materno e paterno, esteja associada às características fenotípicas distintas observadas nas duas pacientes.

➤ Embora tenha sido possível a indicação de genes importantes para os achados fenotípicos das pacientes, é possível que a correlação entre a alteração genética e o fenótipo possa ser influenciado pela ação sinérgica dos mais de 190 genes envolvidos no rearranjo cromossômico estrutural avaliado.

Referências

- AHN, J. W.; BINT, S.; BERGBAUM, A.; MANN, K.; HALL, R. P.; OGILVIE, C. M. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals – results from four years' clinical application for over 8,700 patients. **Molecular Cytogenetics**, vol.6, p.1-6, 2013.
- ANDERSEN, E. F.; CAREY, J. C.; EARL, D. L.; CORZO, D.; SUTTIE, M.; HAMMOND, P.; SOUTH, S. T. Deletions involving genes WHSC1 and LETM1 may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf–Hirschhorn Syndrome. **European Journal of Human Genetics**, vol.22, p.464–470, 2014.
- BAO, L. & SCHORRY, K. A girl with partial trisomy 12q24.31 inherited from her father and a possible novel syndrome transmitted from her mother. **American Journal of Medical Genetics**, vol.138, p.361-364, 2005.
- BAPTISTA, J.; PRIGMORE, E.; GRIBBLE, S.; JACOBS, P.; CARTER, N.; CROLLA, J. Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocation carried by phenotypically normal individuals. **European Journal of Human Genetics**, vol.13, p.1205-1212, 2005.
- BASIT, S.; MALIBARI, O. I.; AL-BALAWI, A. M.; AFZAL, S.; EL-DARDEAR, A. E.; RAMZAN, K. Xq21.31–q21.32 Duplication Underlies Intellectual Disability in a Large Family With Five Affected Males. **American Journal of Medical Genetics**, p.1-7, 2015.
- BATAGLIA, A.; CAREY, J. C.; SOUTH, S. T. Wolf–Hirschhorn syndrome: A review and update. **American Journal of Medical Genetics**, p.1-8, 2015.
- BATAGLIA, A.; FILIPPI, T.; CAREY, J. C. Update on the clinical features and natural history of wolf–hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. **American Journal of Medical Genetics**, vol.148, p.246-251, 2008.
- BAYANI, J.; SQUIRE, J. A. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). **Current Protocols in Cell Biology**, 2004.
- BAYINDIR, B.; PIAZZA, E.; MINA, E. D.; LIMONGELLI, I.; BRUSTIA, F.; CICCONE, R.; VEGGIOTTI, P.; ZUFFARDI, O.; DEGHANI, M. R. Dravet phenotype in a subject with a der(4)t(4;8)(p16.3;p23.3) without the involvement of the LETM1 gene. **European Journal of Medical Genetics**, vol.56, p.551-555, 2013.
- BENN, P. A. Prenatal Diagnosis of Chromosomal Abnormalities through Amniocentesis, In: MILUNSKY, A.; MILUNSKY, J. M. (Org.). **Genetic Disorders and the fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment**. 6 ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010.
- BENUSSI, D. G.; COSTA, P.; ZOLLINO, M.; MURDOLO, M.; PETIX, V.; CARROZZI, M.; PECILE, V. Trisomy 12p and monosomy 4p: phenotype–genotype correlation. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, vol.13, p.199-204, 2009.
- BERGEMANN, A. D.; COLE, F.; HIRSCHHORN, K. The etiology of Wolf–Hirschhorn syndrome. **Trends in Genetics**, vol.21, p.188–195, 2005.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, vol.16, p.6-21, 2002.

- BINT, S. M.; DAVIES, A. F.; OGILVIE, C. M. Multicolor banding remains an important adjunct to array CGH and conventional karyotyping. **Molecular Cytogenetics**, vol.6, p.1-9, 2013.
- BOUNAN, A.; SCHUITEMA, A.; PFUNDT, R.; VAN DE ZANDE, G.; KLEEFSTRA, T. Clinical delineation of a patient with trisomy 12q23q24. **European Journal of Medical Genetics**, vol.56, p.463-469, 2013.
- CATELA, C.; BILBAO-CORTES, D.; SLONIMSKY, E.; KRATSIOS, P.; ROSENTHAL, N.; WELSCHER, P. Multiple congenital malformations of Wolf–Hirschhorn syndrome are recapitulated in *Fgfr11* null mice. **Disease Models Mechanisms** vol.2 p.283–294, 2009.
- CHARI, R.; LOCKWOOD, W. W.; LAM, W. L. Computational Methods for the Analysis of Array Comparative Genomic Hybridization. **Cancer informatics**, vol.2, p.48-58, 2006.
- CHEN, W.; KALSCHUEUR, V.; TZSCHACH, A.; MENZEL, C.; ULLMANN, R.; SCHULZ, M. H.; ERDOGAN, F.; LI, N.; KIJAS, Z.; ARKESTEIJN, G.; PAJARES, I. L.; GOETZ-SOTHMANN, M.; HEINRICH, U.; ROST, I.; DUFKE, A.; GRASSHOFF, U.; GLAESER, B.; VINGRON, M.; ROPERS, H. H. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. **Genome Research**, vol.18, p.1143-1149, 2008.
- CHEN, W.; ULLMANN, R.; LANGNICK C.; MENZEL, C.; WOTSCHOFSKY, Z.; HU, H.; DO`RING, A.; HU, Y.; KANG, H.; TZSCHACH, A.; HOELTZENBEIN, M.; NEITZEL, H.; MARKUS, S.; WIEDERSBERG, E.; KISTNER, G.; RAVENSWAAIJ-ARTS, C.; KLEEFSTRA, T.; KALSCHUEUR, V.; HANS-HILGER R. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next generation paired-end sequencing. **European Journal of Human Genetics**, vol.18, p.539–543, 2010.
- CHENG, J.; ZHU, Y.; HE, S.; LU, Y.; CHEN, J.; HAN, B.; PETRILLO, M.; WRZESZCZYNSKI, K. O.; YANG, S.; DAI, P.; ZHAI, S.; HAN, D.; ZHANG, M. Q.; LI, W.; LIU, X.; LI, H.; CHEN, Z.-Y.; YUAN, H. Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. **American Journal of Human Genetics**, vol.89, p.56-66, 2011.
- CHIBA, H.; HIURA, H.; OKAE, H.; MIYAUCHI, N.; SATO, F.; SATO, A.; ARIMA, T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Pediatrics International**, vol.55, p.542–549, 2013.
- CLANCY, S.; SHAW, K. DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders. **Nature Education**, vol.1, 2008.
- COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; VU, T. H.; BAKER, C.; WILLIAMS, C.; STALKER, H.; HAMID R.; HANNIG, V.; ABDEL-HAMID, H. BADER, P.; MCCRACKEN, E.; NIYAZOV, D.; LEPPIG, K.; THIESE, H.; HUMMEL, M.; ALEXANDER, N.; GORSKI, J.; KUSSMANN, J.; SHASHI, V.; JOHNSON, K.; REHDER, C.; BALLIF, B. C.; SHAFFER, L. G.; EICHLER, E. E. A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. **Nature Genetics**, vol.43, p838–846, 2012.

DODGE, J. E.; OKANO, M.; DICK, F. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.280, p.17986-17991, 2005.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, vol.27, p.351-357, 2009.

ENDELE, S.; FUHRY, M.; PAK, S. J.; ZABEL, B. U.; WINTERPACHT, A. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-Hand Ca-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. **Genomics**, vol.60, p.218-225, 1999.

ENGBERS, H.; VAN DER SMAGT, J. J.; VAN 'T SLOT, R.; VERMEESCH, J. R.; HOCHSTENBACH, R.; POOT, M. Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR2 regions. **European Journal of Human Genetics**, vol.17, p.129-132, 2009.

ERDMANN, J.; GROSSHENNIG, A.; BRAUND, P. S.; KÖNIG, I. R.; HENGSTENBERG, C.; HALL, A. S.; LINSEL-NITSCHKE, P.; KATHIRESAN, S.; WRIGHT, B.; TRÉGOUËT, D. A.; CAMBIEN, F.; BRUSE, P.; AHERRAHROU, Z.; WAGNER, A. K.; STARK, K.; SCHWARTZ, S. M.; SALOMAA, V.; ELOSUA, R.; MELANDER, O.; VOIGHT, B. F.; O'DONNELL, C. J.; PELTONEN, L.; SISCOVICK, D. S.; ALTSHULER, D.; MERLINI, P. A.; PEYVANDI, F.; BERNARDINELLI, L.; ARDISSINO, D.; SCHILLERT, A.; BLANKENBERG, S.; ZELLER, T.; WILD, P.; SCHWARZ, D. F.; TIRET, L.; PERRET, C.; SCHREIBER, S.; EL MOKHTARI, N. E.; SCHÄFER, A.; MÄRZ, W.; RENNER, W.; BUGER, T. P.; KLÜTER, H.; SCHREZENMEIR, J.; RUBIN, D.; BALL, S. G.; BALMFORTH, A. J.; WICHMANN, H. E.; MEITINGER, T.; FISCHER, M.; MEISINGER, C.; BAUMERT, J.; PETERS, A.; OUWEHAND, W. H. ITALIAN ATHEROSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY WORKING GROUP; MYOCARDIAL INFARCTION GENETICS CONSORTIUM; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM; CARDIOGENICS CONSORTIUM, DELOUKAS, P.; THOMPSON, J. R.; ZIEGLER, A.; SAMANI, N. J.; SCHUNKERT, H. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. **Nature Genetics**, vol.41, p.280-282, 2009.

FEINSTEIN, Y.; BORRELL, V.; GARCIA, C.; BURSTYN-COHEN, T.; TZARFATY, V.; FRUMKIN, A.; NOSE, A.; OKAMOTO, H.; HIGASHIJIMA, S.; SORIANO, E.; KLAR, A. F-spondin and mindin: two structurally and functionally related genes expressed in the hippocampus that promote outgrowth of embryonic hippocampal neurons. **Development**, vol.126, p.3637-3648, 1999.

FERGUSON-SMITH, M. A.; History and evolution of cytogenetics. **Molecular Cytogenetics**, vol.8, p.1-8, 2015.

FONSECA, A. C. S.; BONALDI, A.; BERTOLA, D. R.; KIM, C. A.; OTTO, P. A.; VIANNA-MORGANTE, A. M. The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the SOX9 gene: two novel de novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. **Biological Medical Genetics**, vol.14, p.2-10, 2013.

FRANSSSEN, M. T.; KOREVAAR, J. C.; VAN DER VEEN, F.; LESCHOT, N. J.; BOSSUYT, P. M.; GODDIJN, M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. **BMJ** p.759-763, 2006.

GAJECKA, M.; GENTLES, A. J.; TSAI, A.; CHITAYAT, D.; MACKAY, K. L.; GLOTZBACH, C. D.; LIEBER, M. R.; SHAFFER, L. G. Unexpected complexity at breakpoint junctions and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1;22)(p36;q13). **Genome Research**, vol.18, p.1733-1742, 2008.

GAO, J.; LIU, C.; YAO, F.; HAO, N.; ZHOU, J.; ZHOU, Q.; ZHANG, L.; LIU, X.; BIAN, X.; LIU, J. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. **Molecular Cytogenetics**, vol.5, p.33, 2012.

GARDEITCHIK, T.; MOHAMED, M.; FISCHER, B.; LAMMENS, M.; LEFEBER, D.; LACE, B.; PARKER, M.; KIM, K. J.; LIM, B. C.; JOHANNES H.; GARAVELLI, L.; JAGADEESH, S.; KARIMINEJAD, A.; GUERRA, D.; KESKI-FILPPULA, R.; BRUNNER, H.; NIJTMANS, L.; HEUVEL, B.; WEVERS, R.; KORNAK, U.; MORAVA, E. Clinical and biochemical features guiding the diagnostics in neurometabolic cutis laxa. **European Journal of Human Genetics**, vol.22, p.888-895, 2014.

GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R.; SHAFFER, L. G. **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling**, 4^o ed. New York: Oxford, 2012.

Gene Imprinting. Disponível em: < <http://www.geneimprint.com>>. Acesso em: 07 out. 2015.

Genetics Home Reference. Chromosomal inheritance. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: < ghr.nlm.nih.gov/handbook/inheritance/chromosomalinheritance>. Acesso em: 20 jul. 2015.

GOMES, A. G. **Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas**. 2014. 133f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, 2014.

GOUAS, L. ; GOUMY, C.; VÉRONÈSE, A.; TCHIRKOV, A.; VAGO, P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. **Pathologie Biologie**, vol.56, p.345-353, 2008.

GRIBBLE, S. M.; PRIGMORE, E.; BURFORD, D. C.; PORTER, K. M.; NG, B. L. DOUGLAS, E. J.; FIEGLER, H.; CARR, P.; KALAITZOPOULOS, D.; CLEGG, S.; SANDSTROM, R.; TEMPLE, I. K.; THOMAS, N. S.; JACOBS, P. A.; CARTER, N. P. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, vol.42 p.8-16, 2005.

HAMMOND, P.; HANNES, F.; SUTTIE, M.; DEVRIENDT, K.; VERMEESCH, J. R.; FARAVELLI, F.; FORZANO, F.; PAREKH, S.; WILLIAMS, S.; MCMULLAN, D.; SOUTH, S. T.; CAREY, J. C.; QUARRELL, O. Fine-grained facial phenotype-genotype analysis in Wolf–Hirschhorn syndrome. **European Journal of Human Genetics**, vol.20, p.33–40, 2012.

HEHIR-KWA, J. Y.; WIESKAMP, N.; WEBBER, C.; PFUNDT, R.; BRUNNER, H. G.; GILISSEN, C.; VRIES, B. B. A.; PONTING, C. P.; VELTMAN, J. A. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. **PLoS ONE**, vol.6, 2010.

IRELAND, J. W.; JALAL, S. M.; MCGRANN, P. S.; LINDOR, N. M. Nonmosaic smallest duplication of 12q24.31-qter: the first reported case, **American Journal of Medical Genetics**, vol.128, p.305-310. 2004.

ISCN 2013: **an international system for human cytogenetic nomenclature** (2013). Basel; Unionville, CT: Karger, cop. 2013.

IVANOVA, D.; DIRKS, A.; MONTENEGRO-VENEGAS, C.; SCHÖNE, C.; ALTROCK, D. W.; MARINI, C.; FRISCHKNECHT, R.; SCHANZE, D.; ZENKER, M.; GUNDELFINGER, E. D.; FEJTOVA, A. Synaptic activity controls localization and function of CtBP1 via binding to Bassoon and Piccolo. **The embo journal**, vol.34, p.1056–1077, 2015.

JOHN, M. R. & LEFEBVRE, L. Developmental regulation of somatic imprints, **Differentiation**, vol.81, p.270–280, 2011.

KANEDA, M.; OKANO, M.; HATA, K. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. **Nature**, vol.429, p.900–903, 2004.

KARAKUS, N.; KARA, N.; TURAL, S.; KOCAK, I.; ELBISTAN, M. A Retrospective Study of Balanced Chromosomal Translocations in a Turkish Population. **International Journal of Human Genetics**, vol.12, p.319-323, 2012.

KERZENDORFER, C.; HANNES, F.; COLNAGHI, R.; ABRAMOWICZ, I.; CARPENTER, G.; VERMEESH, J. R.; O'DRISCOLL, M. Characterizing the functional consequences of NELF-A (WHSC2) and SLBP identifies novel cellular phenotypes in Wolf–Hirschhorn syndrome. **Human Molecular Genetics**, vol.21 p.2181–2193, 2012.

KIM, J. W.; KIM, S. T.; TURNER, A. R.; YOUNG, T.; SMITH S.; LIU, W.; LINDBERG, J.; EGEVAD, L.; GRONBERG, H.; ISAACS, W. B.; XU, J. Identification of new differentially methylated genes that have potential functional consequences in prostate cancer. **PLoS ONE**, vol.7, p.1-10, 2012.

KLOOSTERMAN; W.; HOCHSTENBACH, R. Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease. **Molecular Cytogenetics**, vol.7, p.1-12, 2014.

LAGIER-TOURENNE, C.; GINGLINGER, E.; ALEMBIK, Y.; SAINT MARTIN, A.; PETER, M. O.; DULUCQ, P.; JONVEAUX, P.; JEANDIDIER, E. Two cousins with partial trisomy 12q and monosomy 12p recombinants of a familial pericentric inversion of the chromosome 12, **American Journal of Medical Genetics**, vol.125 p.77-85, 2004.

LAWSON, A. H.; CHEVERUD, J. M.; WOLF, J. B. Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. **Nature Reviews**, vol.14, p.609-617, 2013.

LEE, J.; C. A. DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. **Cell**, vol.131, p.1235–1247, 2007.

- LETTICE, L. A.; DANIELS, S.; SWEENEY, E.; VENKATARAMAN, S.; DEVENNEY, P. S.; GAUTIER, P.; MORRISON, H.; FANTES, J.; HILL, R. E.; FITZPATRICK, D. R. Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease. **Human Mutation**, vol.32, p.1492–1499, 2011.
- LIEDÉN, A.; KVARNUNG, M.; NILSSON, D.; SAHLIN, E.; LUNDBERG, E. S. Intragenic Duplication—A Novel Causative Mechanism for SATB2 Associated Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, vol.1164, p.3083-3087, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, vol.25, p.402-408, 2001.
- LUO, L. F.; HOU, C. C.; YANG, W. X. Nuclear factors: roles related to mitochondrial deafness. **Gene**, vol.520, p.79-89, 2013.
- LYLE, R.; BENA, F.; GAGOS, S.; GEHRIG, C.; LOPEZ, G.; SCHINZEL, A.; LESPINASSE, J.; BOTTANI, A.; DAHOUN, S.; TAINE, L.; DOCO-FENZY, M.; CORNILLET-LEFEBVRE, P.; PELET, A.; LYONNET, S.; TOUTAIN, A.; COLLEAUX, L.; HORST, J.; KENNERKNECHT, I.; WAKAMATSU, N.; DESCARTES, M.; FRANKLIN, J. C.; FLORENTIN-ARAR, L.; KITSIOU, S.; YAHYA-GRAISON, E. A.; COSTANTINE, M.; SINET, P.; DELABAR, J. M.; ANTONARAKIS, S. E. Genotype–phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. **European Journal of Human Genetics**, vol.17, p.454-466, 2009.
- MACDONALD, J. R.; ZIMAN, R.; YUEN, R. K.; FEUK, L.; SCHERER, S. W. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic Acids Research**, vol.42, p.986-992, 2013.
- MARTELLI, L. **Citogenética clássica e molecular aplicada ao diagnóstico de aberrações cromossômicas**. 2010. 146f. Tese (Livro docência) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, 2010.
- MARTINO, E.; TAYLOR, C. F.; ROULSON, J-A; KNOWLES, M. A. An integrated genomic, transcriptional and protein investigation of FGFR1 as a putative 4p16.3 deletion target in bladder cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, vol.52, p.860–871, 2013.
- MASON-SUARES, H.; KIM, W.; GRIMMETT, L.; WILLIAMS, E. S.; HORNER, V. L.; KUNIG, D.; GOLDLUST, I. S.; WU, B. L.; SHEN, Y.; MILLER, D. T.; MARTIN, C. L.; RUDD, M. K. Density matters: comparison of array platforms for detection of copy-number variation and copy-neutral abnormalities. **Genetics in Medicine**, vol.15, p.706-712, 2013.
- MATOSO, E.; RAMOS, F.; FERRÃO, J.; PIRES, L. M.; MASCARENHAS, A.; MELO, J. B.; CARREIRA, I. M. Interstitial 287 kb deletion of 4p16.3 including fgfr1 gene associated with language impairment and overgrowth. **Molecular Cytogenetics**, vol.7, p.2-5, 2014.
- MELNYK, A. R.; WEISS, L.; DYKE, D. L. V.; JARVI, P. Malformation syndrome of duplication 12q24.1→qter. **American Journal of Medical Genetics**, vol.10, p.357-365, 1981.

- MERGENER, R.; LUDWING, L. B.; MALUF, S. W. Alterações cromossômicas estruturais, in: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. et al., (Org.). **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; CROLLA, J. A.; EICHLER, E. E.; EPSTEIN, C. J.; FAUCETT, W. A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J. M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E. B.; KOK, K.; KRANTZ, I. D.; KUHN, R. M.; ROSENBERG, C. SHERER, S. W.; SPINNER, N. B.; THORLAND, E. C.; WAGGONER, D. J.; WATSON, M. S.; MARTIN, C. L.; LEDBETTER, D. H. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **American Journal of Human Genetics**, vol.86, p.749-764, 2010.
- MISCEO, D.; BAROY, T.; HELLE, J. R.; BRAATEN, O.; FANNEMEL, M.; FRENGEN, E. 1.5 Mb deletion of chromosome 4p16.3 associated with postnatal growth delay, psychomotor impairment, epilepsy, impulsive behavior and asynchronous skeletal development. **Gene**, vol.507, p.85-91, 2012.
- MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. **Nature Reviews Cancer**, vol.7, p.233-45, 2007.
- MONK, D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol.67, p.128-138, 2015.
- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, vol.20, p.613-616, 1960.
- MORAES, A. C.; MORON, A. F.; HASHIMOTO, E. M.; SILVA, I. D. C. G.; TORLONI, M. R.; SOUZA, M. M.; PATRICIO, F. R. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetricia**, 2005.
- MOREL, F.; ROUX, C.; BRESSON, J. L. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. **Molecular Human Reproduction**, vol.7, p.483-488, 2001.
- NAGAOKA, S. I.; HASSOLD, J. T.; HUNT, A. P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. **Nature review genetics**, vol.13, p.493-504, 2012.
- NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, vol.278, p.25-31, 2001.
- NATARAJAN, A.; BOEI, J. J. W. A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research**, vol. 544, 2003.
- NEILL, N. J.; TORCHIA, B. S.; BEJANI, B. A.; SHAFFER, L. G.; BALLIF, B. C. Comparative analysis of copy number detection by whole-genome BAC and oligonucleotide array CGH. **Molecular Cytogenetics**, vol.03, p.1-14, 2010.

- NEWMAN, S.; HERMETZ, K. E.; WECKSELBLATT, B.; RUDD, M. K. Next-Generation Sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. **American Society of Human Genetics**, vol.96, p.208–220, 2015.
- OHKI, I., SHIMOTAKE, N., FUJITA, N., JEE, J., IKEGAMI, T., NAKAO, M., SHIRAKAWA, M. Solution structure of the methyl-cpg binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. **Cell**, v.105, p.487–497, 2001.
- OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, vol.99, p.247–257, 1999.
- PAPADOPOULOU, E.; SISMA, C.; CHRISTODOULOU, C.; LOANNIDES, M.; KALMANTI, M.; PATSALIS, P. Phenotype–Genotype Correlation of a Patient With a “Balanced” Translocation 9;15 and Cryptic 9q34 Duplication and 15q21q25 Deletion. **American Journal of Medical Genetics**, vol.152, p.1515-1522, 2010.
- PARK, S-J.; JUNG, E. H.; RYU, R-S.; KANG, H. W.; KO, J-M.; KIM, H. J.; CHEON, C. K.; HWANG, S-H.; KANG, H-Y. A Multi-Sample Based Method for Identifying Common CNVs in Normal Human Genomic Structure Using High-Resolution aCGH Data. **PLoS ONE**, vol.6, 2011.
- PIERCE, B. A. **Genética: Um enfoque conceitual**. Guanabara Koogan, 3ª ed. 2004.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol.83, p.2934-2938, 1986.
- REIK, W.; WALTER, J. Genomic Imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v.02, p.21-32, 2001.
- RIGGS, E. R.; CHURCH, D. M.; HANSON, K.; HORNER, V. L.; KAMINSKY, E. B.; KUHN, R. M.; WAIN, K. E.; WILLIAMS, E. S.; ARADHYA, S.; KEARNEY, H. M.; LEDBETTER, D. H.; SOUTH, S. T.; THORLAND, E. C.; MARTIN, C. L. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. **Clinical Genetics**, vol.81, p.403–412, 2012.
- RIPPEY, C.; WALSH, T.; GULSUNER, S.; BRODSKY, M.; NORD, A. S.; GASPERINI, M.; PIERCE, S.; SPURRELL, C.; COE, B. P.; KRUMM, N.; LEE, M. K.; SEBAT, J.; MCCLELLAN, J. M.; KING, M. C. Formation of chimeric genes by copy-number variation as a mutational mechanism in schizophrenia. **American Journal of Human Genetics**, vol.93, p. 697–710, 2013.
- ROSENBERG, C.; KNIJNENBURG, J.; BAKKER, E.; VIANA-MORGANTE, A. M.; SLOOS, W.; OTTO, P. A.; KRIEK, M.; HANSSON, K.; KREPISCHI-SANTOS, A. C.; FIEGLER, H.; CARTER, N. P.; BIJLSMA, E. K.; VAN-HAERINGEN, A.; SZUHAI, K.; TANKE, H. J. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **Journal of Medical Genetics**, vol.43, p.180-186, 2006.

ROUKOS, V.; MISTELI, T. The biogenesis of chromosome translocations. **Nature Cell Biology**, vol.16, p.293-300, 2014.

ROUSSEAU, S.; CHEVRET, E.; MONTEIL, M.; COZZI, J.; PELLETIER, R.; DELAFONTAINE, D.; SÈLE, B. Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. **Human Genetics**, vol.96, p.655-660, 1995.

RUITER, M.; KOOLEN, D. A.; PFUNDT, R.; LEEUW, N.; KLINKERS, H. M.; SISTERMANS, E. A.; VELTMAN, J. A.; VRIES, B. B. A novel 2.3 Mb microduplication of 12q24.21q24.23 detected by genome-wide tiling-path resolution array comparative genomic hybridization in a girl with syndromic mental retardation, **Clinical Dysmorphology**, vol.15, p.133-137 2006.

SCHERES, J. M. J. C. Human chromosome banding. **Lancet**, vol.1, p.849, 1972.

SCHLUTH-BOLARD, C.; LABALME, A.; CORDIER, M. P.; TILL, M.; NADEAU, G.; TEVISSSEN, H.; LESCA, G.; BOUTRY-KRYZA, N.; ROSSIGNOL, S.; ROCAS, D.; DUBRUC, E.; EDERY, P.; SANLAVILLE, D. Breakpoint by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. **Journal Medical Genetics**, vol.50, p.144-150, 2013.

SHCHELOCHKOV, O. A.; PATEL, A.; WEISSENBERGER, G. M.; CHINAULT, A. C.; WISZNIEWSKA, J.; FERNANDES, P. H.; ENG, C.; KUKOLICH, M.K.; SUTTON, V. R. Duplication of chromosome band 12q24.11q24.23 results in apparent Noonan syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, vol.146, p.1042-1048, 2008.

SHIMIZU, K.; WAKUI, K.; KOSHO, T.; OKAMOTO, N.; MIZUNO, S.; ITOMI, K.; HATTORI, S.; NISHIO, K.; SAMURA, O.; KOBAYASHI, Y.; KAKO, Y.; ARAI, T.; TSUTOMU, O. I.; KAWAE, H.; NARUMI, Y.; OHASHI, H.; FUKUSHIMA, Y. Microarray and FISH-Based Genotype-Phenotype Analysis of 22 Japanese Patients With Wolf-Hirschhorn Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, vol.164, p.597-609, 2013.

SISMANI, C.; KITSIOU-TZELI, S.; IONNIDES, M.; CHRISTODOULOU, C.; ANASTASIADOU, V.; STYLIANIDOU, G.; PAPADOPOULOU, E.; KANAVAKIS, E.; KOSMAIDOU-ARAVIDOU, Z.; PATSALIS, P. C. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. **Molecular Cytogenetics**, vol.1 p.1-9, 2008.

SMEETS, D. F. C. M. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. **Clinical Biochemistry**, vol.37, p.439-446, 2004.

SMITH, A. C.; SUZUKI, M.; THOMPSON, R.; CHOUFANI, S.; HIGGINS, M. J.; CHIU, I. W.; SQUIRE, J. A.; GREALLY, J. M.; WEKSBERG, R. Maternal gametic transmission of translocations or inversions of human chromosome 11p15.5 results in regional DNA hypermethylation and downregulation of CDKN1C expression. **Genomics**, vol. 99, p. 25-35, 2012.

- SOUTH, S.T.; BLEYL, S. B.; CAREY, J. C. Two unique patients with novel microdeletions in 4p16.3 that exclude the WHS critical regions: Implications for critical region designation. **American Journal of Medical Genetics**, vol.143, p.2137–2142, 2007.
- SOUTH, S. T.; LEE, C.; LAMB, A. N.; HIGGINS, A. W.; KEARNEY, H. M. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. **Genetics in Medicine**, vol.15, p.901-909, 2013.
- SOUTH, S.T.; WHITBY, H.; BATTAGLIA, A.; CAREY, J. C.; BROTHMAN, A. R. Comprehensive analysis of Wolf–Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. **European Journal of Human Genetics**, vol.16, p.45–52, 2008.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. **Annual Review of Medicine**, p.437-455, 2010.
- SUGIURA-OGASAWARA, M.; OZAKI, Y.; SATO, T.; SUZUMORI, N.; SUZUMORI, K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. **Fertility and Sterility**, vol.81 p.367-373, 2004.
- SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**, vol.93, p.309-312, 1998.
- SUZUKI, T.; TSURUSAKI, Y.; NAKASHIMA, M.; MIYAKE, N.; SAITSU, H.; TAKEDA, S.; MATSUMOTO, N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. **Journal of Human Genetics**, vol.59, 649-654, 2014.
- TAJARA, E. H.; VARELA-GARCIA, M.; GUSSON, A. C. T. Partial trisomy 12q24.31→qter. **Journal of Medical Genetics**, vol.22 p.73-76, 1985.
- TEMPLADO, C.; BOSH, M.; BENNET, J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.111, p.199-205, 2005.
- TOMMERUP, N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. **Journal of Medical Genetics**, vol.30, p.713-727, 1993.
- TOMOEDA, K.; AWATA, H.; MATSUURA, T.; MATSUDA, I.; PLOECHL, E.; MILOVAC, T.; BONEH, A.; SCOTT, C. R.; DANKS, D. M.; ENDO, F. Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. **Molecular Genetics Metabolism**, vol.71, p.506-510, 2000.
- TRUEB, B. Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol.68, p.951–964, 2011.
- TRUEB, B. & TAESCHLER, S. Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. **International Journal of Molecular Medicine**, vol.17, p.617-620, 2006.

TURNPENNY, P. D.; ELLARD, S. **Emery Genética Médica**. 13^a ed. São Paulo: Elsevier, 2009.

UTAMI, K. H.; HILLMER, A. M.; AKSOY, I.; CHEW, E. G.; TEO, A. S.; ZHANG, Z.; LEE, C. W.; CHEN, P. J.; SENG, C. C.; ARIYARATNE, P. N.; ROUAM, S. L.; SOO, L. S.; YOUSOOF, S.; PROKUDIN, I.; PETERS, G.; COLLINS, F.; WILSON, M.; KAKAKIOS, A.; HADDAD, G.; MENUET, A.; PERCHE, O.; TAY, S. K.; SUNG, K. W.; RUAN, X.; RUAN, Y.; LIU, E. T.; BRIAULT, S.; JAMIESON, R.V.; DAVILA, S.; CACHEUX, V. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. **PLoS ONE**, vol.9 p.1-9, 2014.

VAGLIO, A.; MILUNSKY, A.; HUANG, X. L.; QUADRELLI, A.; MECHOSO, B.; QUADRELLI, R. A fourteen years follow-up of a case of partial trisomy 12q and monosomy 12p recombinants of a familial pericentric inversion of chromosome 12: clinical, cytogenetic and molecular observations. **European Journal of Medical Genetics**, vol.50 p.224-232, 2007.

VOZDOVA, M.; KASIKOVA, K.; ORACOVA, E.; PRINOSILOVA, P.; RYBAR, R.; HORINOVA, V.; GAILLYOVA, R.; RUBES, J. The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. **Human Reproduction**, Vol.27, p.930-937, 2012.

WHALLEY, H. C.; DIMITROVA, R.; SPROOTEN, E.; DAUVERMANN, M. R.; ROMANIUK, L.; DUFF, B.; WATSON, A. R.; MOORHEAD, B.; BASTIN, M.; SEMPLE, S.I.; GILES, S.; HALL, J.; THOMSON, P. ROBERTS, N.; HUGHES, Z. A.; BRANDON, N. J.; DUNLOP, J.; WHITCHER, B.; BLACKWOOD, D. H.R.; MCINTOSH, A. M.; LAWRIE, S. M. Effects of a balanced translocation between chromosomes 1 and 11 disrupting the DISC1 locus on white matter integrity. **PLoS One**, vol.10, p.1-14, 2015.

WATSON, C.; MARQUES-BONET, T.; SHARP, A.; MEFORD, H. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. **The Annual Review of Genomics and Human Genetics**, vol.15, p.215-244, 2014.

WECKSELBLATT B.; HERMETZ, E. K.; RUDD, K. M. Unbalanced translocations arise from diverse mutational mechanisms including chromothripsis. **Genome Research**, vol. 25, p.937-947, 2015.

WECKSELBLATT, B. & RUDD, K. M. Human structural variation: mechanisms of chromosome rearrangements. **Article in Press**, p.01-10, 2015.

WILKIE, A. O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Reviews* vol.16 p.187-203, 2005.

WILSON, C. J. & OEI, P. T. S. P. The use of a specific clinical history in counselling a family with the balanced translocation 46,XY,t(4;12)(p15.2;q21.3): viable offspring with partial monosomy 4p and trisomy 12q. **Clinical Genetics**, vol.54, p.110-11, 1998.

WISEMAN, F. K.; ALFORD, K. A.; TYBULEWICZ, V. L. J.; FISHER, E. M. .C. Down syndrome recent progress and future prospects. **Human Molecular Genetics**, vol.18, p.75-83, 2009.

WU, C. T.; MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, vol.10, p.1003-1005, 2001.

ZARREI, M.; MACDONALD, J. R.; MERICO, D.; SCHERER, S. W. A copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics*, vol.16, p.172-183, 2015.

ZHANG, H.-G.; LIU, X. Y.; HOU, Y.; CHEN S.; DENG, S.; LIU R.-Z. Reproductive outcome of a case with familial balanced translocation t(3;6): implications for genetic counseling. *Genetics and Molecular Research*, vol.14, p.2809-2815, 2015.

ZHANG, H.; SU, D.; YANG, Y.; ZHANG, W.; LIU, Y.; BAI, G.; MA, M.; MA, Y.; ZHANG, S. Some single-nucleotide polymorphism of the TSSK2 gene may be associated with human spermatogenesis impairment. *Journal of Andrology*, vol.31, p.388-392, 2009.

ZHANG, Z.; RUIVENKAMP, C.; STAAF, J.; ZHU, H.; BARBARO, M.; PETILLO, D.; ZHOO, S. K.; BORG, A.; FAN, Y.; SCHOUMANS, J. Detection of submicroscopic constitutional chromosome aberrations in clinical diagnostics: a validation of the practical performance of different array platforms. *European Journal of Human Genetics*, vol.16, p.786-792, 2008.

ZOLLINO, M.; MURDOLO, M.; MARANGI, G.; PECILE, V.; GALASSO, C.; MAZZANTI, L.; NERI, G. On the nosology and pathogenesis of Wolf–Hirschhorn Syndrome: Genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *American Journal of Medical Genetics*, vol.148, p.257–269, 2008.

ZOLLINO, M.; ORTESCHI, D.; RUITER, M.; PFUNDT, R.; STEINDL, K.; CAFIERO, C.; RICCIARDI, S.; CONTALDO, I.; CHIEFFO, D.; RANALLI, D.; ACQUAFONDATA, C.; MURDOLO, M.; MARANGI, G.; ASARO, A.; BATTAGLIA, D. Unusual 4p16.3 deletions suggest an additional chromosome region for the Wolf-Hirschhorn syndrome-associated seizures disorder. *Epilepsia*, vol.55, p.849–857, 2014.

Referências Online

Database of Genomic Variants (DGV): <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

Decipher v9.2: <https://decipher.sanger.ac.uk/>

Ensembl.org: <http://www.ensembl.org/index.html>

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Gene Cards a Human Gene Database: <http://www.genecards.org/>

Gene Imprinting: <http://www.geneimprint.com>

Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

MethPrimer: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>

National Center for Biotechnology Information, NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Online Mendelian Inheritance in man OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Primer3: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

University of California, Santa Cruz, UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/>

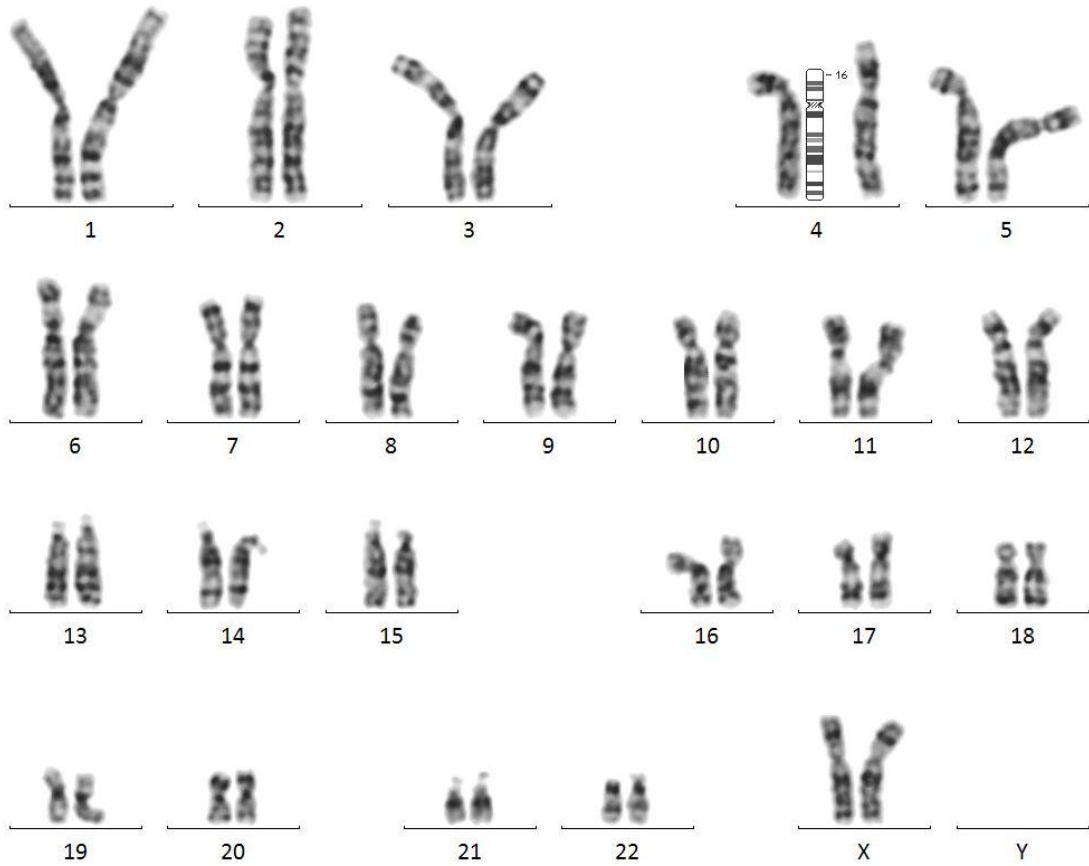
US National Library of Medicine National Institutes of Health PubMed.gov:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Apêndices

Apêndice I

Citogenética Clássica

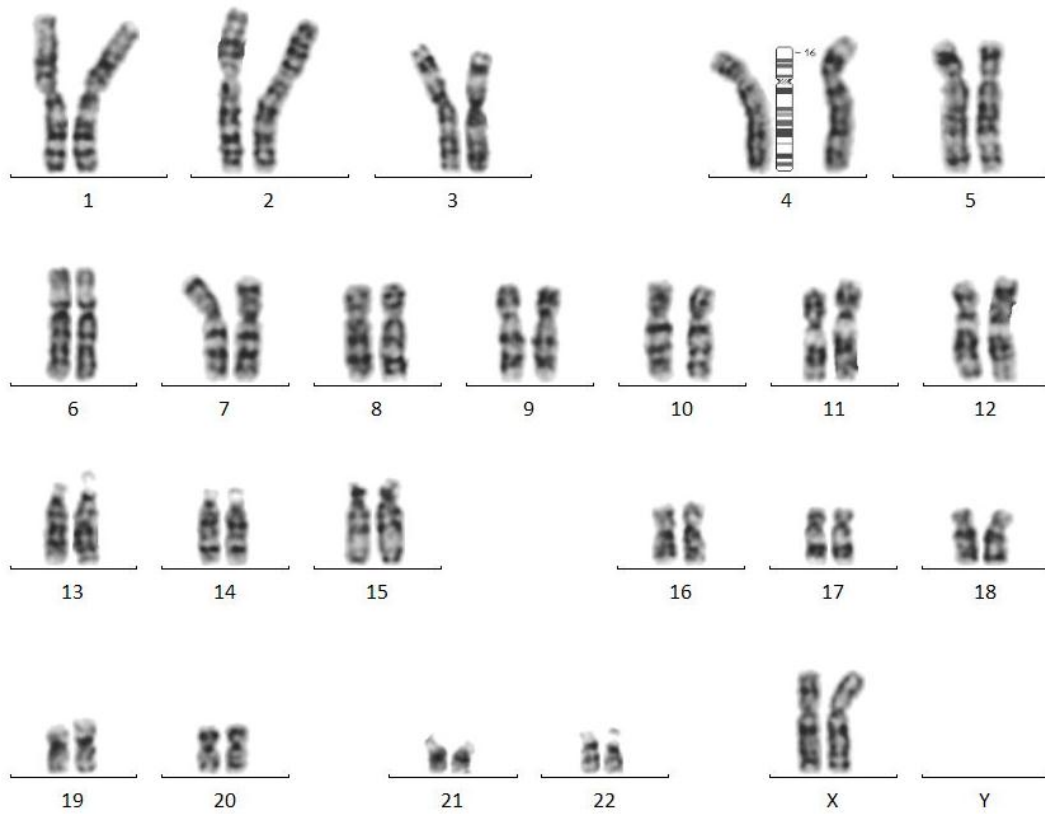
Cariótipo por bandamento GTG de todos os familiares avaliados



Cariótipo de P1: 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?)pat

Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

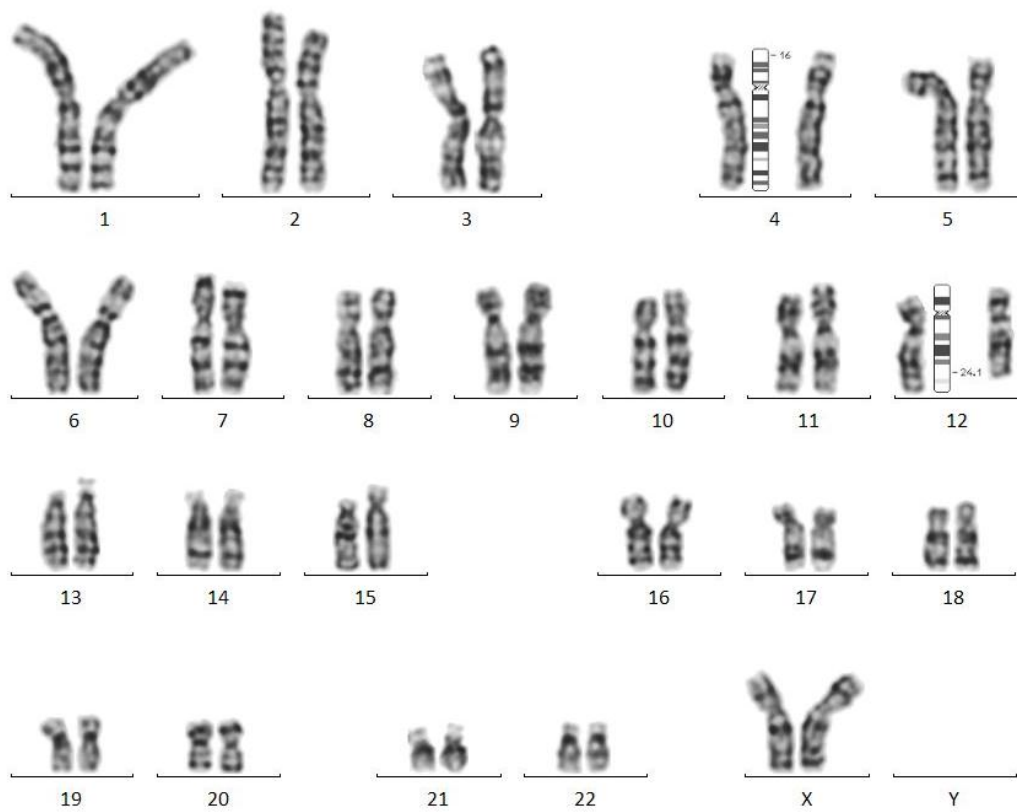
46,XX,der(4)(12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)pat



Cariótipo de P2: 46,XX,der(4)t(4;12)(p16;q24.1?)mat

Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

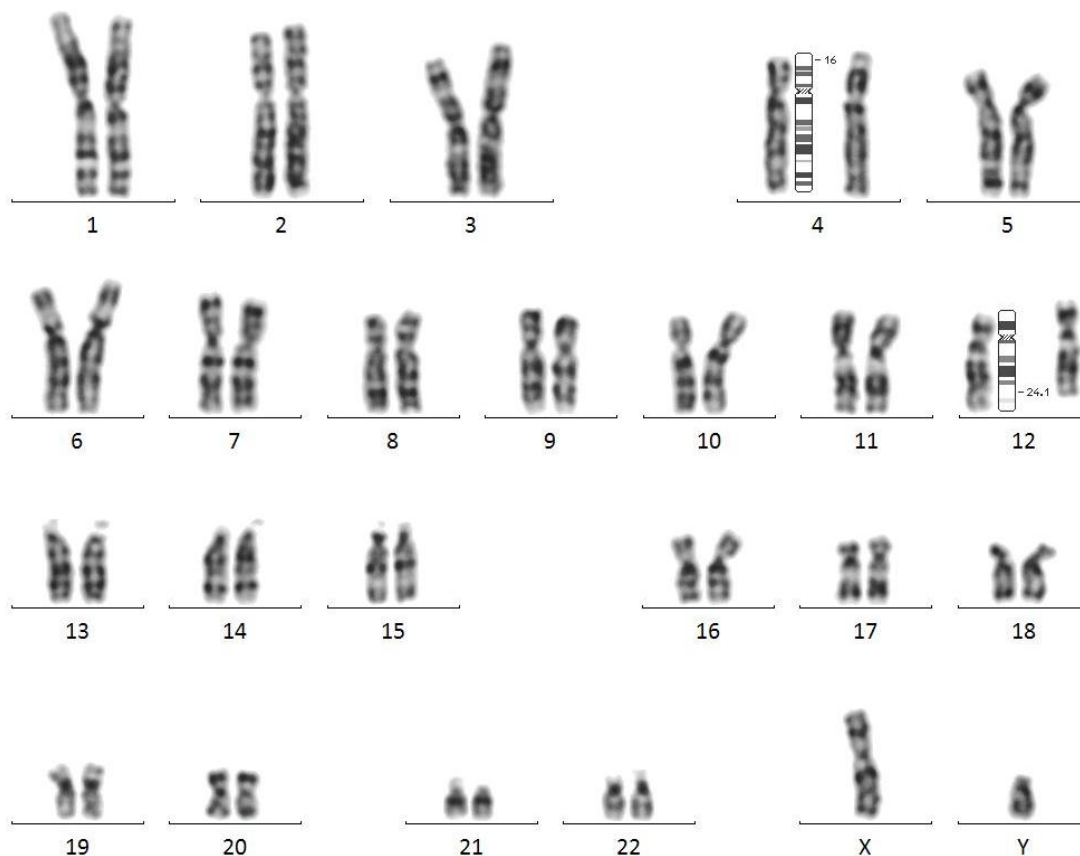
46,XX,der(4)(12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat



Cariótipo: I-2: 46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)

Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

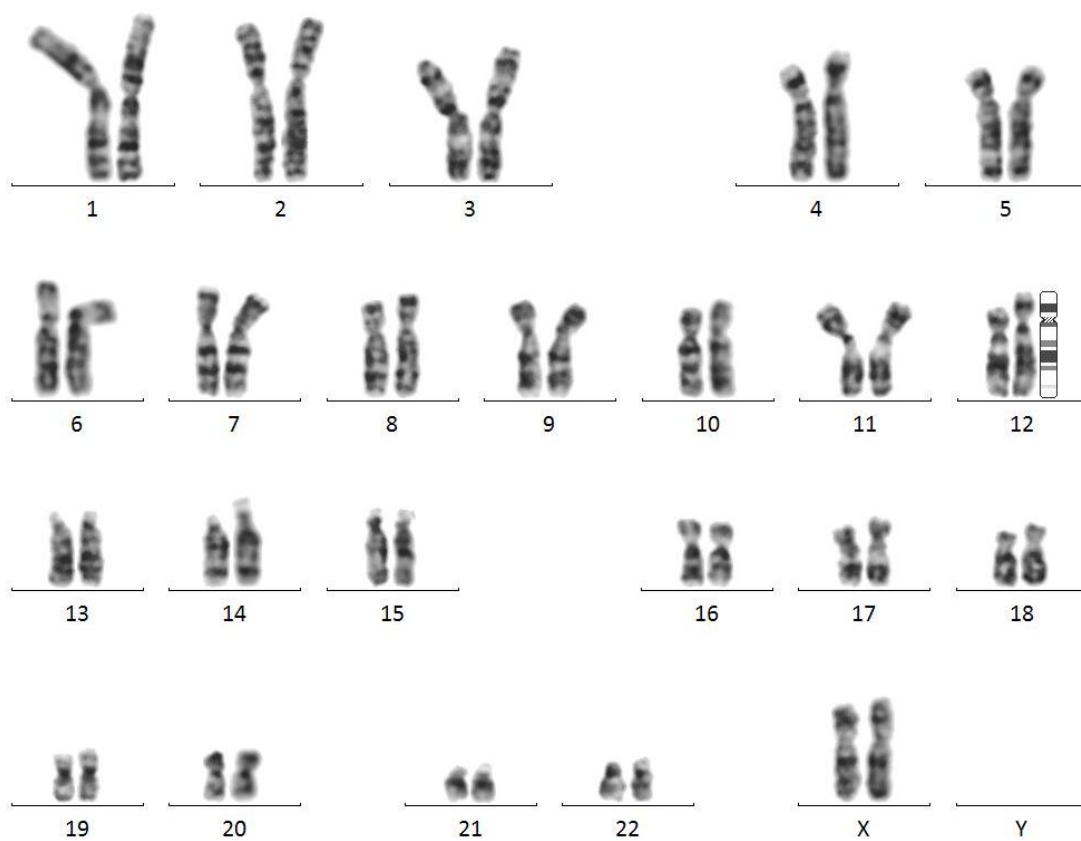
46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter;12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)



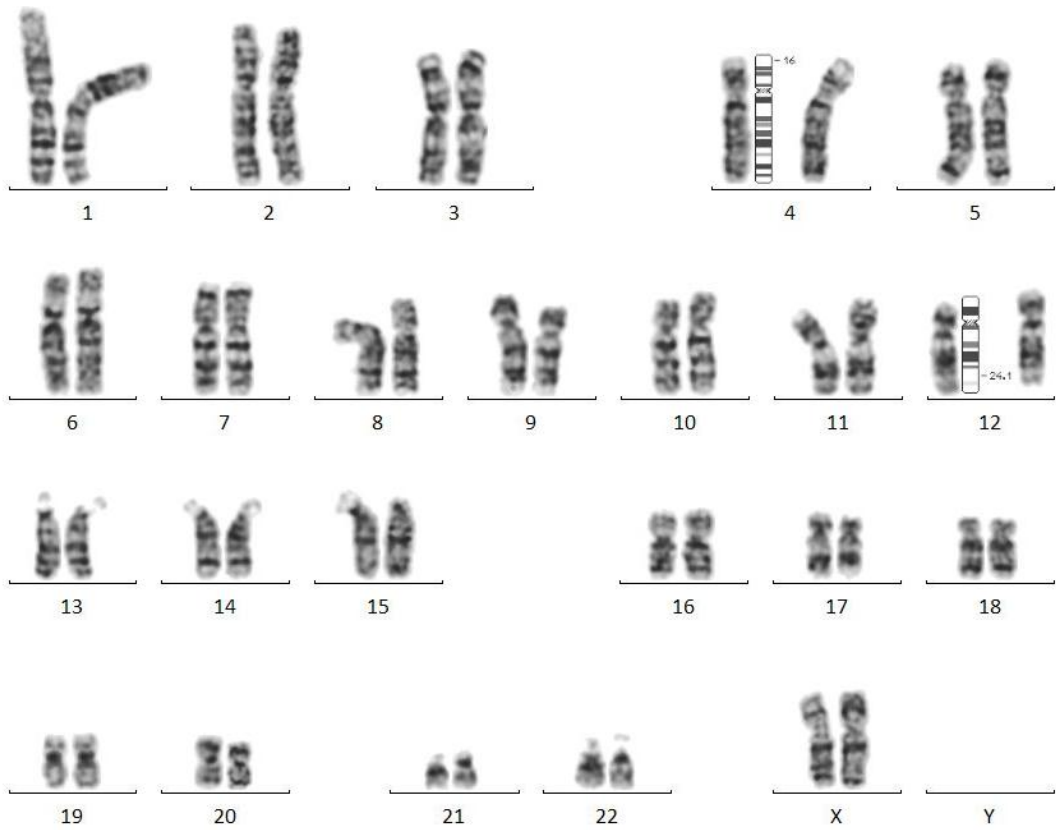
Cariótipo de II-2: 46,XY,t(4;12)(p16;q24.1?)mat

Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

46,XY,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter;12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat



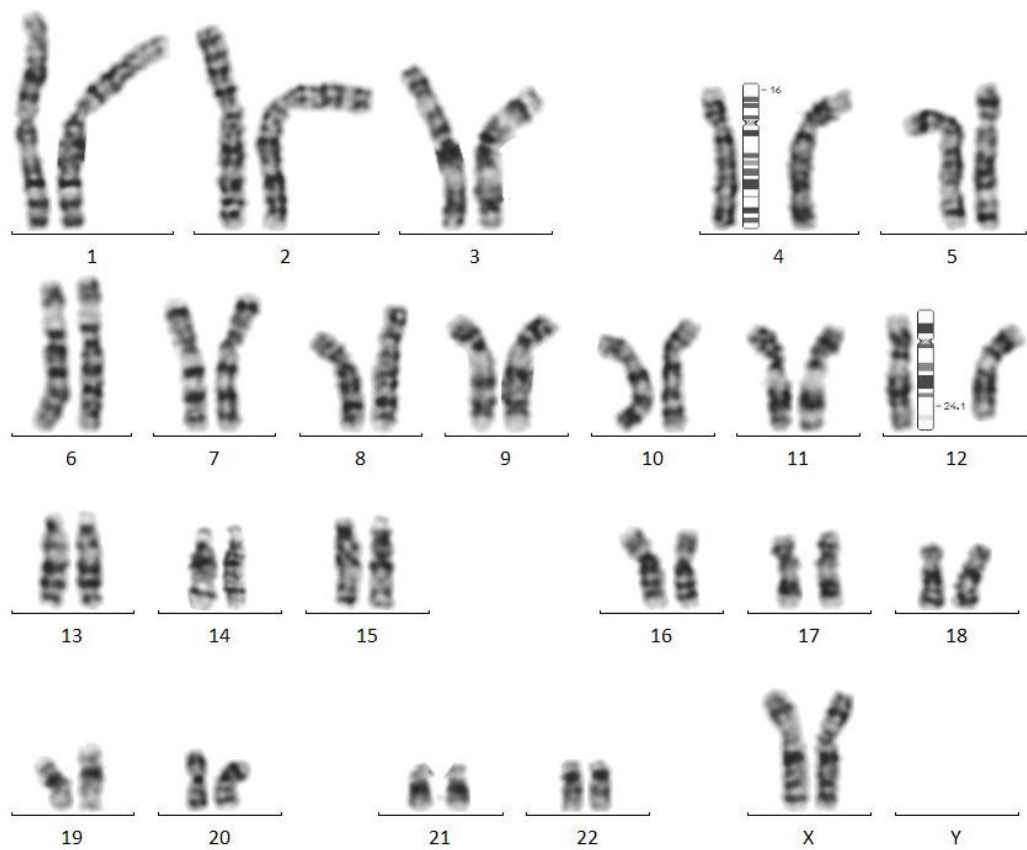
Cariótipo de II-3: 46,XX



Cariótipo de II-10: 46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)mat

Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter;12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat



Cariótipo de III-7: 46,XX,t(4;12)(p16;q24.1?)mat

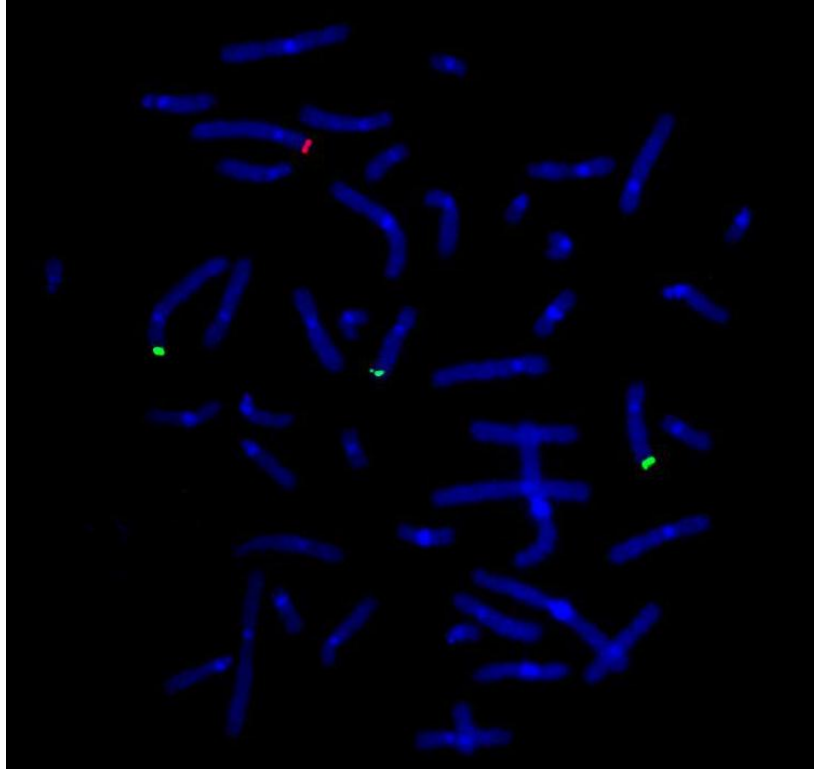
Cariótipo definitivo após a aplicação da técnica de *array*-CGH

46,XX,t(4;12)(4pter→4p16.3::12q24.31→12qter;12qter→12q24.31::4p16.3→4pter)mat

Apêndice II

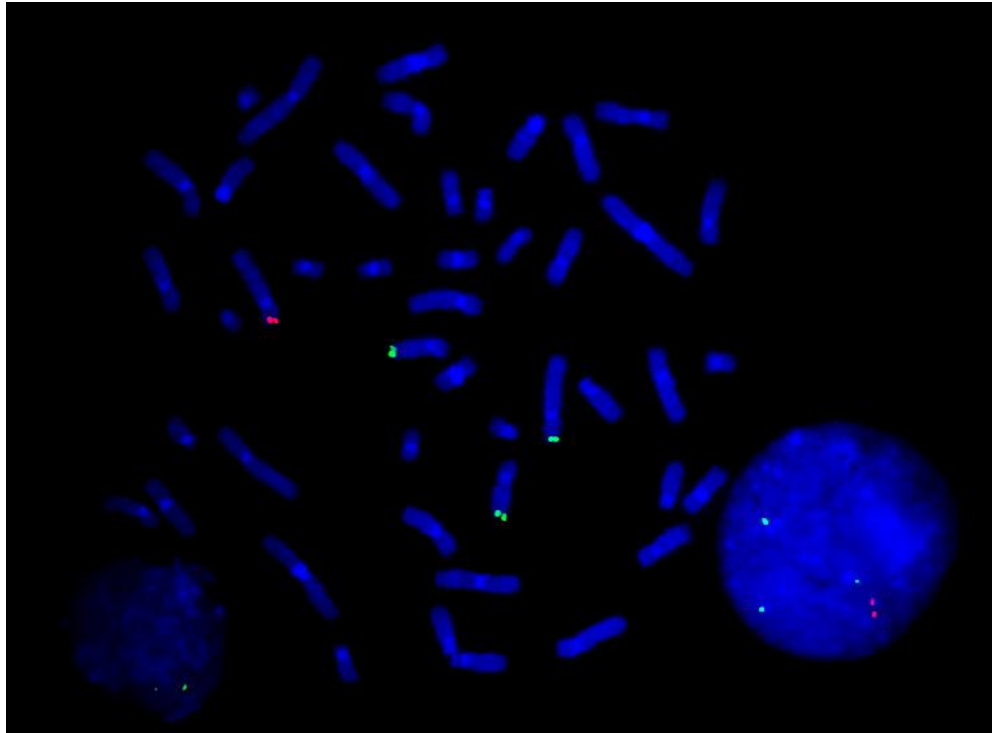
Citogenética Molecular

Técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente de todos os familiares avaliados.



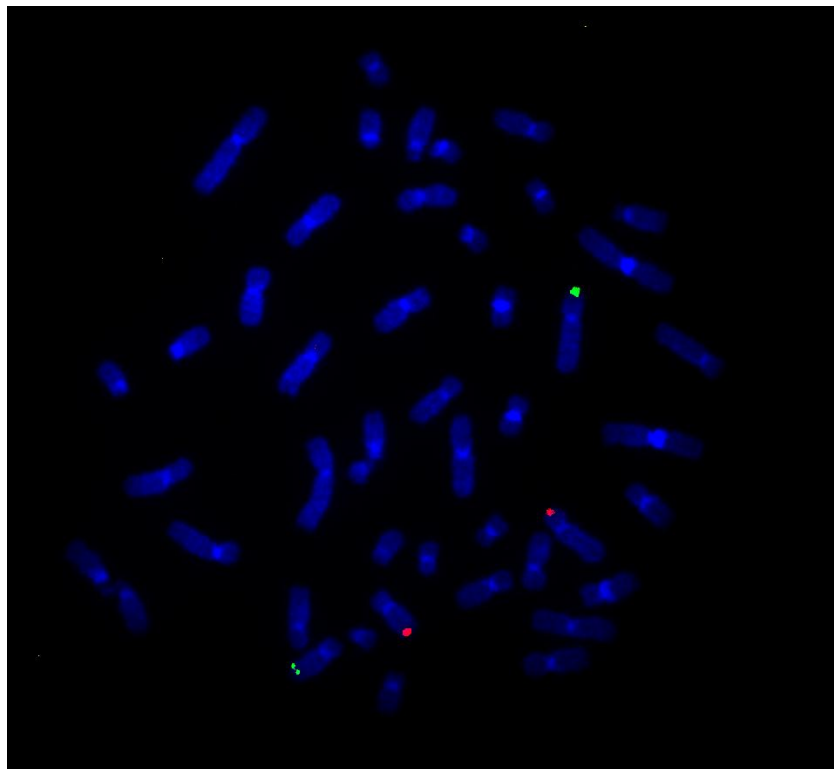
FISH de P1:

46,XX.ish der(4)t(4;12)(p16.3;q24.33)pat(D4S168-,D4S43-,D12S367+)



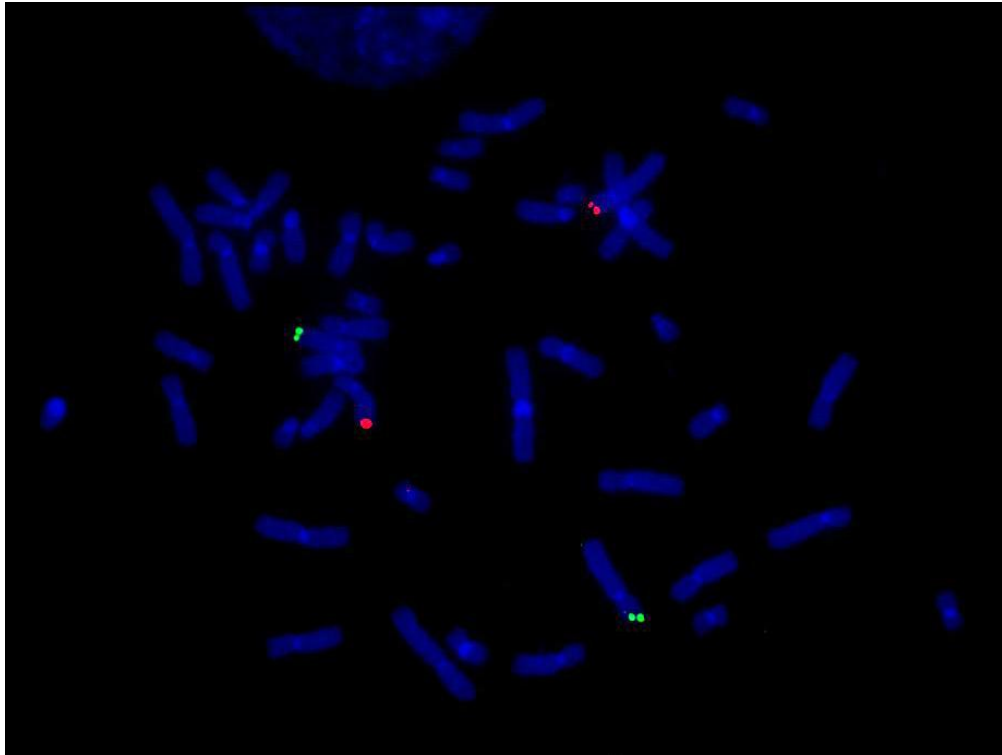
FISH de P2:

46,XX.ish der(4)t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+)



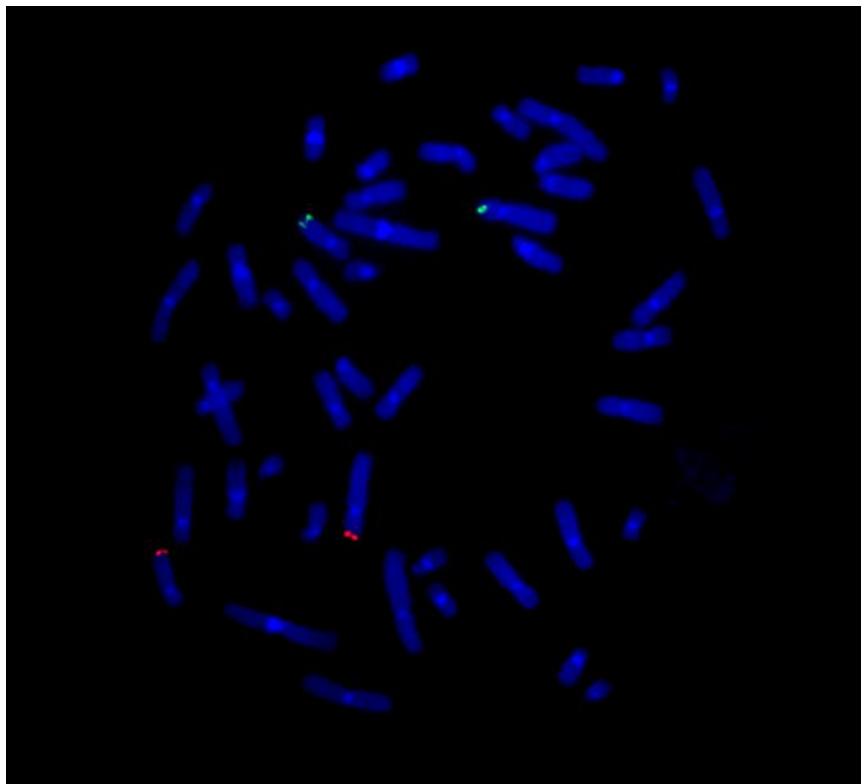
FISH de I-2:

46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)(D4S168-,D4S43-,D12S367+;D12S367-,D4S168+,D4S43+)



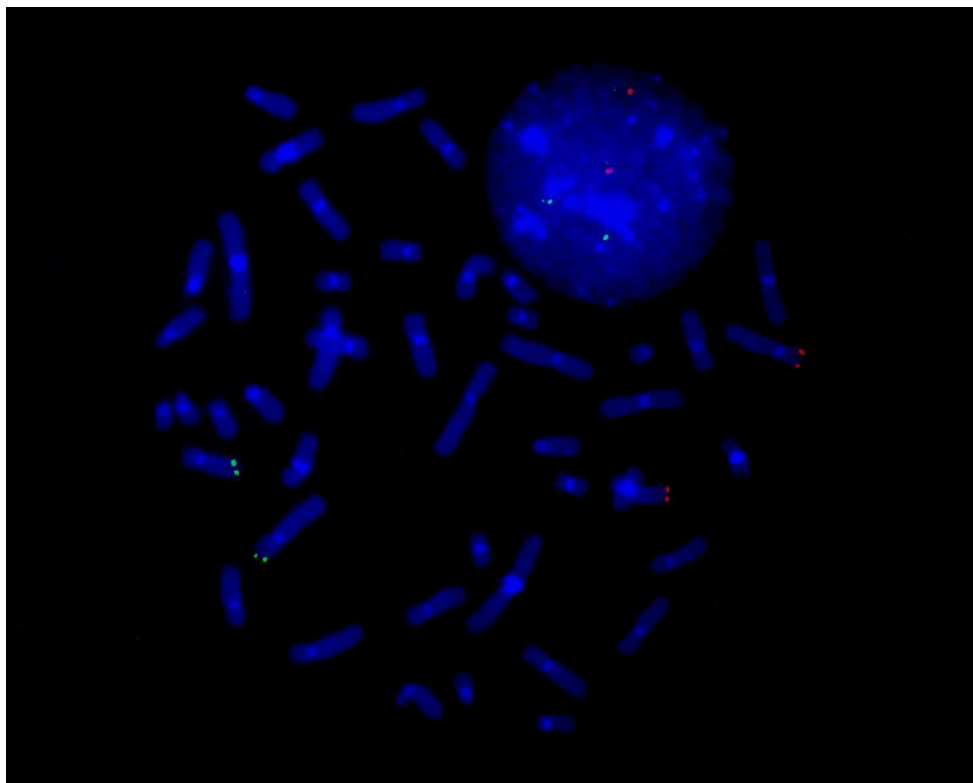
FISH de II-2:

46,XY.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+;D12S367-,D4S168+,D4S43+)



FISH de II-10:

46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+;D12S367-,D4S168+,D4S43+)



FISH de III-7:

46,XX.ish t(4;12)(p16.3;q24.33)mat(D4S168-,D4S43-,D12S367+;D12S367-,D4S168+,D4S43+)

Apêndice III

Citogenômica

Diagnóstico citogenômico após aplicação da técnica de aCGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent[®], USA), de todos os familiares avaliados.

P1	<p>arr[hg19] 1q21.2(148,936,653-149,698,105)x3; 1q44(248,715,191-248,810,117)x3; 3q26.1(162,509,678-162,624,660)x3;4p16.3(73,629-2,780,849)x1; 8p11.22(39,230,689-39,389,316)x0; 12q24.31-q24.33(121,446,691-133,851,895)x3; 16p13.3(1,155,788-1,193,432)x3;19p13.3(1,287,455-1,314,382)x3; 20p13(1,561,076-1,590,485)x3;22q11.23-q12.1(25,663,319-25,915,351)x3</p>
P2	<p>arr[hg19] 1q44(248,733,443-248,810,117)x3;4p16.3(69,881-2,780,849)x1; 4q13.2(69,305,095-69,545,980)x3;8p11.22(39,246,652-39,389,316)x3; 8q24.23(137,686,453-137,856,355)x1; 12q24.31-q24.33(121,458,011-133,851,895)x3; 22q11.23(24,342,813-24,400,297)x0</p>
I-2	<p>arr[hg19]1p31.1(72,766,876-72,806,287)x0;1q44(248,715,191-248,810,117)x3; 4q13.2(69,305,095-69,545,980)x3;8p11.22(39,230,689-39,389,316)x0; 12p13.2(11,215,560-11,258,192)x3;12q24.33(132,952,960-133,037,753)x3; 16p12.1(25,069,126-25,139,749)x1;22 q11.23-q12.1(25,671,276-25,900,899)x3</p>
II-2	<p>arr[hg19] 1p31.1(72,766,876-72,806,287)x0;5p13.3(32,104,599-32,170,464)x3; 8p11.22(39,230,689-39,389,316)x0;11q11(55,364,925-55,432,167)x3; 16p11.2-p11(34,446,302-34,767,569)x3;19q13.41(53,519,508-53,553,821)x3; 20q11.21(53,519,508-53,553,821)x3;22q11.23-q12.1(25,820,564-25,915,351)x3</p>
II-10	<p>arr[hg19]1p31.1(72,766,876-72,806,287)x0;1q44(248,715,191-248,810,117)x3; 3q12.2(100,335,239-100,448,343)x3;3q26.1(162,509,678-162,624,660)x0; 4q13.2(69,305,095-69,545,980)x3;7p22.3(1,049,699-1,065,537)x3; 8p11.22(39,236,244-39,389,316)x3;8q24.23(137,686,453-137,856,355)x1; 10q26.3(134,861,412-134,897,280)x3;12q24.33(132,958,982-133,037,753)x3; 14q11.2(19,597,938-20,387,913)x3;14q32.33(106,528,911-106,580,607)x0; 15q26.3(102,430,480-102,531,392)x3;19q13.2(41,445,954-41,515,434)x1; 20p13(1,561,076-1,590,485)x3;21q22.3(47,619,133-47,635,842)x3; 22q11.21(19,719,210-19,758,825)x3;22q11.33(50,690,156-50,732,777)x3</p>
III-7	<p>arr[hg19]1p31.1(72,766,876-72,806,287)x0;1q44(248,733,443-248,810,117)x3; 4q13.2(69,305,095-69,545,980)x3;12p13.31(9,657,745-9,727,101)x0; 12p13.2(11,215,560-11,250,767)x3;15q11.1-q11.2(20,457,306-22,667,640)x3; 20p13(1,561,076-1,590,485)x3;22q11.23(24,342,813-24,400,297)x0</p>

Alterações encontradas em **P1** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda cromossômica	Nº de Sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:148,936,653-149,698,105	Ganho	761453	q21.2	27	12	<i>NBPF25P, LOC645166, LOC388692, FAM231D, FCGR1C, RNVU1-19, PPIAL4B, PPIAL4C, LINC00623, RNVU1-20, LINC00869, LOC103091866</i>
chr1:248,715,191-248,810,117	Ganho	94927	q44	15	5	<i>OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
chr3:162,509,678-162,624,660	Ganho	114983	q26.1	10	0	
chr4:73,629-2,780,849	Perda	2707221	p16.3	475	53	<i>ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG, PDE6B, ATP5I, MYL5, MFSD7, PCGF3, LOC100129917, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFRL1, RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1-AS, CTBP1, CTBP1-AS2, MAEA, UVSSA, CRIPAK, NKX1-1, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3, FGFR3, LETM1, WHSC1, SCARNA22, MIR943, NELFA, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2</i>
chr8:39,230,689-39,389,316	Perda em homozigose	158628	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
chr12:121,446,691-133,851,895	Ganho	12405205	q24.31 - q24.33	1184	139	<i>C12orf43, OASL, P2RX7, P2RX4, CAMKK2, ANAPC5, RNF34, MIR7107, KDM2B, ORAI1, MORN3, TMEM120B, RHOF, LINC01089, SETD1B, HPD, PSMD9, WDR66, BCL7A, MLXIP, IL31, LRRC43, B3GNT4, DIABLO, LOC101593348, VPS33A, CLIP1, CLIP1-AS1, ZCCHC8, RSRC2, KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCAR1, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, MIR4304, PITPNM2, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1, MIR8072, SETD8, RILPL2, SNRNP35, RILPL1, MIR3908, LOC101927415, TMED2, DDX55, EIF2B1, GTF2H3, TCTN2, ATP6V0A2, DNAH10, CCDC92, ZNF664, ZNF664-FAM101A, FAM101A, MIR6880, NCOR2, SCARB1, UBC, MIR5188, DHX37, BRI3BP, THRIL, AACS, TMEM132B, LINC00939, LOC101927464, LOC100128554, LOC100996671, LINC00943, LINC00944, LOC440117, LOC101927592, LOC101927616, LOC101927637, FLJ37505, LINC00507, LOC100996679, LOC101927694, MIR3612, TMEM132C, SLC15A4, GLT1D1, LOC283352, LOC101927735, TMEM132D, LOC100190940, FZD10-AS1, FZD10, PIWILI, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, LINC01257, LOC338797, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, SNORA49, EP400NL, DDX51, NOC4L, GALNT9, LOC100130238, LOC101928416, FBRSL1, MIR6763, LRCOL1, P2RX2, POLE, PXMP2, PGAM5, ANKLE2, GOLGA3, CHFR, LOC101928530, ZNF605, ZNF26, LOC101928597, ZNF84, ZNF140, ZNF891, ZNF10, ZNF268, ANHX</i>
chr16:1,155,788-1,193,432	Alto ganho	37645	p13.3	6	0	
chr19:1,287,455-1,314,382	Alto ganho	26928	p13.3	5	1	<i>EFNA2</i>
chr20:1,561,076-1,590,485	Alto ganho	29410	p13	6	1	<i>SIRPBI</i>
chr22:25,663,319-25,915,351	Ganho	252033	q11.23 - q12.1	53	4	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1, MIR6817</i>

Alterações encontradas em **P2** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho em pb	Banda cromossômica	Nº de Sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:248,733,443-248,810,117	Ganho	76675	q44	14	4	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
chr4:69,881-2,780,849	Perda	2710969	p16.3	491	53	<i>ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG, PDE6B, ATP5I, MYL5, MFSDF7, PCGF3, LOC100129917, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFRL1, RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1-AS, CTBP1, CTBP1-AS2, MAEA, UVSSA, CRIPAK, NKX1-1, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3, FGFR3, LETM1, WHSC1, SCARNA22, MIR943, NELFA, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2</i>
chr4:69,305,095-69,545,980	Ganho	240886	q13.2	12	3	<i>TMPRSS11E, UGT2B17, UGT2B15</i>
chr8:39,246,652-39,389,316	Ganho	142665	p11.22	25	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
chr8:137,686,453-137,856,355	Perda	169903	q24.23	13	0	
chr12:121,458,011-133,851,895	Ganho	12393885	q24.31 - q24.33	1185	138	<i>OASL, P2RX7, P2RX4, CAMKK2, ANAPC5, RNF34, MIR7107, KDM2B, ORAI1, MORN3, TMEM120B, RHOF, LINC01089, SETD1B, HPD, PSMD9, WDR66, BCL7A, MLXIP, IL31, LRRC43, B3GNT4, DIABLO, LOC101593348, VPS33A, CLIP1, CLIP1-AS1, ZCCHC8, RSRC2, KNTC1, HCAR2, HCAR3, HCAR1, DENR, CCDC62, HIP1R, VPS37B, ABCB9, OGFOD2, ARL6IP4, MIR4304, PITPNM2, LOC100507091, MPHOSPH9, C12orf65, CDK2AP1, SBNO1, MIR8072, SETD8, RILPL2, SNRNP35, RILPL1, MIR3908, LOC101927415, TMED2, DDX55, EIF2B1, GTF2H3, TCTN2, ATP6V0A2, DNAH10, CCDC92, ZNF664, ZNF664-FAM101A, FAM101A, MIR6880, NCOR2, SCARB1, UBC, MIR5188, DHX37, BRI3BP, THRIL, AACS, TMEM132B, LINC00939, LOC101927464, LOC100128554, LOC100996671, LINC00943, LINC00944, LOC440117, LOC101927592, LOC101927616, LOC101927637, FLJ37505, LINC00507, LOC100996679, LOC101927694, MIR3612, TMEM132C, SLC15A4, GLT1D1, LOC283352, LOC101927735, TMEM132D, LOC100190940, FZD10-AS1, FZD10, PIWIL1, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, LINC01257, LOC338797, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, SNORA49, EP400NL, DDX51, NOC4L, GALNT9, LOC100130238, LOC101928416, FBRSLI, MIR6763, LRCOL1, P2RX2, POLE, PXMP2, PGAM5, ANKLE2, GOLGA3, CHFR, LOC101928530, ZNF605, ZNF26, LOC101928597, ZNF84, ZNF140, ZNF891, ZNF10, ZNF268, ANHX</i>
chr22:24,342,813-24,400,297	Perda em homozigose	57485	q11.23	10	4	<i>GSTTP1, LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>

Alterações encontradas em **I-2** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda Cromossômica	Nº de sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:72,766,876-72,806,287	Perda em homozigose	39412	p31.1	5	0	
chr1:248,715,191-248,810,117	Ganho	94927	q44	15	5	<i>OR2T29</i> , <i>OR2T34</i> , <i>OR2T10</i> , <i>OR2T11</i> , <i>OR2T35</i>
chr4:69,305,095-69,545,980	Ganho	240886	q13.2	12	3	<i>TMPRSS11E</i> , <i>UGT2B17</i> , <i>UGT2B15</i>
chr8:39,230,689-39,389,316	Perda em homozigose	158628	p11.22	28	2	<i>ADAM5</i> , <i>ADAM3A</i>
chr12:11,215,560-11,258,192	Ganho	42633	p13.2	8	3	<i>PRH1-PRR4</i> , <i>PRH1</i> , <i>TAS2R43</i>
*chr12:132,952,960-133,037,753	Ganho	84794	q24.33	10	0	
*chr16:25,069,126-25,139,749	Perda	70624	p12.1	8	2	<i>LCMT1-AS1</i> , <i>LCMT1</i>
*chr22:25,671,276-25,900,899	Ganho	229624	q11.23 - q12.1	48	4	<i>IGLL3P</i> , <i>LRP5L</i> , <i>CRYBB2P1</i> , <i>MIR681</i>

Alterações encontradas em **II-2** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent®, USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda Cromossômica	Nº de sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:72,766,876-72,806,287	Perda em homozigose	39412	p31.1	5	0	
chr5:32,104,599-32,170,464	Ganho	65866	p13.3	13	2	<i>PDZD2</i> , <i>GOLPH3</i>
chr8:39,230,689-39,389,316	Perda em homozigose	158628	p11.22	28	2	<i>ADAM5</i> , <i>ADAM3A</i>
chr11:55,364,925-55,432,167	Ganho	67243	q11	12	3	<i>OR4C11</i> , <i>OR4P4</i> , <i>OR4S2</i>
chr16:34,446,302-34,767,569	Ganho	321268	p11.2 - p11.1	24	3	<i>LOC283914</i> , <i>LOC146481</i> , <i>LOC100130700</i>
chr19:53,519,508-53,553,821	Ganho	34314	q13.41	6	2	<i>ERVV-1</i> , <i>ERVV-2</i>
chr20:30,025,027-30,083,169	Ganho	58143	q11.21	10	4	<i>DEFB123</i> , <i>DEFB124</i> , <i>REMI</i> , <i>LINC00028</i>
chr22:25,820,564-25,915,351	Ganho	94788	q11.23 - q12.1	18	2	<i>CRYBB2P1</i> , <i>MIR6817</i>

Alterações encontradas em **II-10** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent[®], USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda Cromossômica	Nº de sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:72,766,876-72,806,287	Perda em homozigose	39412	p31.1	5	0	
chr1:248,715,191-248,810,117	Ganho	94927	q44	15	5	<i>OR2T29</i> , <i>OR2T34</i> , <i>OR2T10</i> , <i>OR2T11</i> , <i>OR2T35</i>
chr3:100,335,239-100,448,343	Ganho	113105	q12.2	22	2	<i>GPR128</i> , <i>TFG</i>
chr3:162,509,678-162,624,660	Perda em homozigose	114983	q26.1	10	0	
chr4:69,305,095-69,545,980	Ganho	240886	q13.2	12	3	<i>TMPRSS11E</i> , <i>UGT2B17</i> , <i>UGT2B15</i>
chr7:1,049,699-1,065,537	Ganho	15839	p22.3	8	2	<i>MIR339</i> , <i>C7orf50</i>
chr8:39,236,244-39,389,316	Ganho	153073	p11.22	26	2	<i>ADAM5</i> , <i>ADAM3A</i>
chr8:137,686,453-137,856,355	Perda	169903	q24.23	13	0	
chr10:134,861,412-134,897,280	Alto ganho	35869	q26.3	7	0	
chr12:11,215,560-11,258,192	Ganho	42633	p13.2	8	3	<i>PRH1-PRR4</i> , <i>PRH1</i> , <i>TAS2R43</i>
chr12:132,375,300-132,407,210	Ganho	31911	q24.33	6	1	<i>ULK1</i>
chr12:132,958,982-133,037,753	Alto ganho	78772	q24.33	9	0	
chr14:19,597,938-20,387,913	Ganho	789976	q11.2	24	15	<i>LINC01296</i> , <i>DUXAP10</i> , <i>BMS1P17</i> , <i>BMS1P18</i> , <i>BMS1P17</i> , <i>BMS1P18</i> , <i>LINC01296</i> , <i>DUXAP10</i> , <i>POTEM</i> , <i>LOC100508046</i> , <i>OR11H2</i> , <i>OR4Q3</i> , <i>OR4M1</i> , <i>OR4N2</i> , <i>OR4K2</i>
chr14:106,528,911-106,580,607	Perda em homozigose	51697	q32.33	7	0	
chr15:102,430,480-102,531,392	Ganho	100913	q26.3	4	6	<i>OR4F4</i> , <i>FAM138E</i> , <i>WASH3P</i> , <i>MIR6859-1</i> , <i>MIR6859-2</i> , <i>DDX11L9</i>
chr19:41,445,954-41,515,434	Perda	69481	q13.2	12	2	<i>CYP2B7P</i> , <i>CYP2B6</i>
chr20:1,561,076-1,590,485	Alto Ganho	29410	p13	6	1	<i>SIRPB1</i>
chr21:47,619,133-47,635,842	Alto Ganho	16710	q22.3	4	1	<i>LSS</i>
chr22:19,719,210-19,758,825	Ganho	39616	q11.21	10	1	<i>TBX1</i>
chr22:50,690,156-50,732,777	Ganho	42622	q13.33	9	3	<i>MAPK12</i> , <i>MAPK11</i> , <i>PLXNB2</i>

Alterações encontradas em **III-7** pela técnica de *array*-CGH plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit*, 2x400K (Agilent[®], USA).

Posição Genômica	Evento	Tamanho (pb)	Banda Cromossômica	Nº de sondas	Nº de genes	Símbolos dos Genes
chr1:72,766,876-72,806,287	Perda em homozigose	39412	p31.1	5	0	
chr1:248,733,443-248,810,117	Ganho	76675	q44	14	4	<i>OR2T34</i> , <i>OR2T10</i> , <i>OR2T11</i> , <i>OR2T35</i>
chr4:69,305,095-69,545,980	Ganho	240886	q13.2	12	3	<i>TMPRSS11E</i> , <i>UGT2B17</i> , <i>UGT2B15</i>
chr12:9,657,745-9,727,101	Perda	69357	p13.31	9	0	
chr12:11,215,560-11,250,767	Ganho	35208	p13.2	6	3	<i>PRH1-PRR4</i> , <i>PRH1</i> , <i>TAS2R43</i>
chr15:20,457,306-22,667,640	Alto ganho	2210335	q11.1-q11.2	72	22	<i>CHEK2P2</i> , <i>HERC2P3</i> , <i>GOLGA6L6</i> , <i>GOLGA8CP</i> , <i>NBEAP1</i> , <i>POTEB2</i> , <i>POTEB</i> , <i>LOC102724631</i> , <i>NF1P2</i> , <i>LINC01193</i> , <i>LOC646214</i> , <i>CXADRP2</i> , <i>POTEB2</i> , <i>POTEB</i> , <i>LOC102724631</i> , <i>NF1P2</i> , <i>LOC727924</i> , <i>LOC101927079</i> , <i>OR4M2</i> , <i>OR4N4</i> , <i>OR4N3P</i> , <i>REREP3</i>
chr20:1,561,076-1,590,485	Alto ganho	29410	p13	6	1	<i>SIRPB1</i>
chr22:24,342,813-24,400,297	Perda em homozigose	57485	q11.23	10	4	<i>GSTTP1</i> , <i>LOC391322</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTTP2</i>

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Estamos convidando você a participar de um projeto de pesquisa do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, intitulado “**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS**”, que tem como pesquisadores responsáveis Tatiana Mozer Joaquim e Profa. Dra. Lucia Regina Martelli (CREMESP 40.569). O objetivo deste estudo é avaliar a constituição genética do paciente para podermos explicar seus sintomas.

Para isso, será necessária a coleta de uma amostra de sangue de aproximadamente 5mL, utilizando uma agulha fina, o que pode causar desconforto, dor local e raramente, uma marca roxa que desaparecerá com o tempo, sem nenhum risco para a saúde. O material genético extraído da amostra permitirá avaliar todos os cromossomos (constituição genética) do paciente e se as mudanças encontradas podem explicar os sinais e sintomas apresentados. O material coletado será utilizado exclusivamente para esse projeto sendo descartado após o término da pesquisa.

Sua participação neste estudo não envolverá teste de novos procedimentos ou tratamentos, portanto sua saúde física não sofrerá nenhum risco.

Informamos que:

1. Sua participação é espontânea e opcional;
2. Caso você decida não participar, ou desista de participar da pesquisa a qualquer momento, você não perderá nenhum benefício ou tratamento que estiver fazendo neste Hospital;
3. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre as alterações cromossômicas e sua relação com características clínicas;
4. Para preservação de anonimato, os participantes serão identificados apenas por números e todas as informações coletadas serão mantidas em absoluto sigilo;
5. Você receberá uma via deste Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) devidamente assinada pelo participante e pelo pesquisador responsável;
6. A participação não trará nenhum benefício direto para sua saúde.

Caso haja qualquer dúvida, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelos telefones (16) 3315-3081 (laboratório), 3602-2598 (secretaria), ou com Tatiana pelo telefone (16) 982562652.

Declaro que concordo com as condições que me foram apresentadas e aceito participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

Nome do Paciente ou responsável

Assinatura do paciente ou responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

Nome do Pesquisador responsável

Assinatura do Pesquisador responsável

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HCFMRP) (Anexo II)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 03 de setembro de 2015

Ofício nº 3150/2015
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS” - Versão 3, de agosto de 2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 414ª Reunião Ordinária realizada em 31/08/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Versão 3, de 28/08/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 7491/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

TATIANA MOZER

PROF^a. DR^a. LUCIA REGINA MARTELLI (Orientadora)

Depto. de Genética – FMRP-USP

Resumo Clínico das Pacientes analisadas (Anexo III)

Paciente 1 (P1)

Cariótipo: 7444

HD: Cromossomopatia: 46,XX,der(4)t(4;12)(p16.3q24.1?)pat

Evoluindo com: Dificuldade de ganho pômdero estatural, ADNPM, deficiência intelectual grave + distúrbio comportamental (hiperatividade) + perda auditiva e dismorfismos.

Única filha de casal não consanguíneo. Mãe com 37 anos e pai com 28 anos ao nascimento da probanda. Mãe negou intercorrências no pré-natal. Criança nasceu de parto cesárea eletiva, a termo, com APGAR 6/9, Peso ao nascimento de 2500g (p25/50), perímetro cefálico de 31cm (p10). Observado hipotonia, fenda de palato e apnéia, permanecendo internada por 28 dias. No internamento, observado sopro cardíaco, realizado então ecocardiograma, com CIA de 3mm. Observado dismorfias e indicado cariótipo.

HF: Casal não consanguíneo

B1, Pai de P1, 28 anos ao nascimento da probanda, portador de translocação equilibrada 46,XY,t(4;12)(p16.3;q24.1?)mat

C1, Mãe de P1, 37 anos ao nascimento da probanda, hígida.

B2, Tio de P1, faleceu com 2a 9m, portador de malformações, cariótipo de São José do Rio Preto, 46,XY,der(4),t(4;12)mat.

Exame Físico:

1. Dismorfológico: Microbraquicefalia, face triangular, orelhas displásicas, frontal amplo, astigmatismo, hipoplasia de hélices bilateralmente, sobrancelhas espessas com rarefação do terço distal, ponte nasal alargada, fendas palpebrais oblíquas para cima, ptose de pálpebras, ausência de alguns dentes permanentes, retrognatia, discreta clinodactilia de quinto

quirodáctilo, pés planos, frouxidão articular distal, desvio em valgo das pernas, estrabismo de olho direito, fosseta sacral.

2. Genitália: genitália feminina com clitóris de 2,4x1,2cm e presença de pelos até raiz de coxa (M1P4); presença de pelos em axila e odor.

Paciente 2 (P2)

Cariótipo: 8062

HD: Cromossomopatia 46,XXder(4)t(4;12)(p16.3;q24.1?)mat

Evoluindo com: Deficiência Intelectual grave + dismorfismos

Exame Físico:

1. Antropometria: (17 a) P: 18kg (< p3 e <p3 corrigido); C: 126cm (<p3 X: 7 a6m) PC: 45,5cm (<p3 e <p3 corrigido) IC: 23/28 (82%) DIE: 7cm; DII: 2,5cm e FP: 2,5cm; MT: 10,5cm; DM: 4,5cm; Rel: 42,8%

2. Dismorfológico: Microbraquicefalia, Déficit pôn timero estatural, hipoplasia de face média, proptose, nariz em bico com raiz nasal alta, microretrognatia, microtia à direita e orelha em concha à esquerda com presença de apêndice, rarefação do terço distal de sobrancelha, hipoplasia de aletas nasais, pés evertidos, escoliose, joelhos valgos e fosseta sacral.

HPP: ITU com 1 mês de vida; convulsões a partir dos 8 meses de vida em vigência ou não de febre, tendo uma das crises com 3h de duração, PANS severa (perda auditiva neurossensorial severa), Refluxo vesicoureteral.

DNPM: Sustento cefálico: 24m, restante não atingiu.