

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

**Caracterização Citogenética Molecular de
Cromossomos Marcadores Extranumerários**

Ana Carolina Laus

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para concorrer ao título de Doutor, pelo curso de Pós-Graduação em Genética.

Ribeirão Preto
2008

Ana Carolina Laus

**Caracterização Citogenética Molecular de
Cromossomos Marcadores Extranumerários**

**Molecular Cytogenetic Characterization of
Supernumerary Marker Chromosomes**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
concorrer ao título de Doutor, pelo
curso de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Martelli

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Laus, Ana Carolina

Caracterização Citogenética Molecular de Cromossomos Marcadores Extranumerários. Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

143 p.: il. ; 30cm

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

Orientadora: Martelli, Lúcia.

1. Cromossomos marcadores; 2. SKY; 3. FISH; 4. Correlação cariótipo-fenótipo.

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, ANA E EDUARDO.

AOS MEUS IRMÃOS, FERNANDA E EDUARDO.

AOS MEUS AVÓS, ADELHEID E JOSÉ AUGUSTO, ELZA E ALBERTO.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Lúcia Martelli** pela orientação, apoio, incentivo, carinho e amizade.

Ao **Sílvio Avelino dos Santos** pela infinita ajuda durante os procedimentos práticos deste trabalho, pela disposição, cooperação e grande amizade.

Ao **Dr. Jair Huber e aos médicos residentes** do Ambulatório de Genética Médica do HCFMRP-USP pela ajuda imprescindível durante a fase de coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

À **Lucimar Laureano e Maria Lúcia Machado** pelo auxílio durante os procedimentos práticos e disponibilidade do laboratório de Citogenética do HCFMRP-USP.

Ao **Prof. Jeremy Squire** pelas sondas fornecidas para realização deste trabalho, pelas correções nos artigos, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Ao **Prof. Dr. Raysildo B. Lôbo** por favorecer os projetos científicos desenvolvidos no Bloco C do Departamento de Genética da FMRP – USP e pela agradável convivência diária.

À **Profa. Dra. Ester S. Ramos** pela contribuição para minha formação acadêmica.

À amiga **Juliana** pelos grandes momentos de alegria, pelas confidências compartilhadas e pela amizade, que se perpetuará para sempre.

Aos amigos **Daniel e Dante** pela grande amizade, compreensão, confiança e ótima convivência.

.Às amigas **Silvina, Luciana e Juliana Meola** pelas discussões científicas, pelas conversas casuais e momentos de descontração.

Aos demais **colegas do Bloco C** do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e companheirismo.

Aos meus pais, **José Eduardo e Ana Maria** pelo carinho, apoio incondicional e amor.

Aos meus irmãos, **Fernanda e Eduardo** pela amizade inestimável.

Ao **Paulo** pelo apoio, compreensão, amizade e amor.

Ao **Departamento de Genética da FMRP-USP** pela disponibilidade de todas as suas instalações.

Às agências de fomento à pesquisa, **CNPq, CAPES e FAEPA**.

Aos **pacientes e suas famílias** que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. CROMOSSOMOS MARCADORES.....	21
1.1.1. CROMOSSOMOS MARCADORES DERIVADOS DE UM ÚNICO CROMOSSOMO	22
1.1.2. CROMOSSOMOS MARCADORES TRANSLOCADOS.....	23
1.1.3. CROMOSSOMOS MARCADORES ISOCROMOSSOMOS E ISODICÊNTRICOS.....	24
1.1.4. CROMOSSOMOS MARCADORES EM ANEL	25
1.1.5. CROMOSSOMOS MARCADORES ISOCROMOSSOMOS COM NEO-CENTRÔMEROS.....	27
1.1.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE CROMOSSOMOS MARCADORES E FENÓTIPO	28
1.1.7. CROMOSSOMOS MARCADORES E INFERTILIDADE.....	31
1.2. CITOGENÉTICA MOLECULAR	32
1.2.1. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE – FISH.....	34
1.2.2. TÉCNICA DE CARIÓTIPO ESPECTRAL – SKY	36
1.2.3. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA – CGH	37
1.2.4. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ARRAY – CGH-ARRAY	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. CASUÍSTICA	42
3.2. MATERIAL.....	44
3.3. METODOLOGIA.....	44
4. RESULTADOS	51
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	101
7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	103
8. ANEXOS	120
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	134

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Esquema ilustrativo da segregação meiótica em um portador de translocação aparentemente balanceada $t(A;B)$. Um erro de segregação do tipo 3:1 gera dois tipos de gameta, um deles contendo dois cromossomos normais (A e B) e um translocado (T). No caso de uma fecundação desse gameta, o zigoto formado apresentará um par cromossômico A normal, um par cromossômico B normal e um cromossomo marcador translocado (adaptado de Gardner e Sutherland, 2004).

Fig. 2: Esquema ilustrativo da troca tipo U na meiose resultante de erros no *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não-disjunção na meiose I. A quebra ocorre corretamente, mas a reunião se dá incorretamente, formando um cromossomo isodicêntrico e um fragmento acêntrico, que normalmente é perdido durante as divisões celulares subsequentes. A não-disjunção dos cromossomos homólogos durante a meiose I dá origem a gametas que contêm um cromossomo normal e o cromossomo alterado. O zigoto originado desses gametas possuirá um par cromossômico normal e um cromossomo marcador isodicêntrico (adaptado de Dewald, 1983).

Fig. 3: Esquema ilustrativo da formação de um cromossomo isocromossomo e isodicêntrico por fissão centromérica. Quando a fissão ocorre no meio do centrômero, ocorre formação de um isocromossomo de braço curto e um de braço longo. Quando a quebra ocorre na região proximal do centrômero, ocorre a formação de um fragmento acêntrico e um cromossomo isodicêntrico (adaptado de de la Chapelle, 1982).

Fig. 4: Esquema ilustrativo da formação de um cromossomo marcador em anel. Uma quebra ocorre na região proximal ao centrômero de uma das cromátides-irmãs e esse fragmento forma um anel. Durante a meiose, o anel pode ser segregado com o cromossomo deletado ou com o cromossomo normal. No segundo caso, o zigoto formado após a fecundação possuirá um par de cromossomos normais e um cromossomo extranumerário em anel (adaptado de Schuffenhauer, 1996).

Fig. 5: Esquema ilustrativo da troca tipo U na meiose resultante de erros no *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não-disjunção na meiose I. Esse processo leva à

formação de um fragmento acêntrico, que pode desenvolver um neo-centrômero, ser incluído num gameta e assim ser segregado para as células filhas (adaptado de Dewald, 1983).

Fig. 6: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 1 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 7: Cariótipo 47,XY,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

Fig. 8: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de quatro sinais verdes, dois referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e dois sinais presentes no cromossomo marcador (seta amarela), indicando a presença de duas regiões centroméricas, caracterizando o marcador como dicêntrico.

Fig. 9: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 2 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 10: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(9) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 9.

Fig. 11: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP9 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 9 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 9.

Fig. 12: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 3 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 13: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(9) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 9.

Fig. 14: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP9 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois

cromossomos 9 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 9.

Fig. 15: Cariótipo 48,XX,+2mar em bandeamento GTG, referente à paciente 4 da amostra. Os cromossomos marcadores extranumerários estão indicados pela seta vermelha.

Fig. 16: Cariótipo 48,XX,+mar.ish der(4),+mar em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 4 e a seta azul indica o marcador de origem indeterminada.

Fig. 17: Célula metafásica e parte de núcleo interfásico após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas teloméricas de braço curto (*spectrum green*) e braço longo (*spectrum orange*) do cromossomo 4, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes referentes aos cromossomos 4 normais (setas amarelas). Também foram observados dois sinais verdes e dois sinais vermelhos no núcleo interfásico, confirmando o resultado observado na metáfase. Não foi observado nenhum sinal referente aos cromossomos marcadores, mas foi observada região centromérica nos 48 cromossomos, sugerindo a presença de centrômero em ambos os marcadores.

Fig. 18: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 5 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 19: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

Fig. 20: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de quatro sinais verdes, dois referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e dois sinais presentes no cromossomo marcador (seta amarela), indicando a presença de duas regiões centroméricas e caracterizando o marcador como dicêntrico.

Fig. 21: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 6 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 22: Cariótipo 46,XX,t(11;22)(q25;q11.2) em bandeamento GTG, referente à mãe do paciente 6 da amostra. Os cromossomos envolvidos na translocação estão indicados pelas setas vermelhas.

Fig. 23: Cariótipo espectral 47,XY,+mar.ish der(22)t(11;22). A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado de uma translocação entre os cromossomos 11 e 22, de herança materna.

Fig. 24: À direita, célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCP22 (*spectrum orange*), evidenciando a presença de três sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais (seta amarela) e ao cromossomo marcador (seta verde); à esquerda, célula metafásica em coloração DAPI, evidenciando a presença de região centromérica no cromossomo marcador (seta vermelha).

Fig. 25: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 7 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 26: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

Fig. 27: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 15.

Fig. 28: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 8 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

Fig. 29: Cariótipo 46,XX,t(15;16)(q13;q13) em bandeamento GTG, referente à mãe do paciente 8 da amostra. Os cromossomos envolvidos na translocação estão indicados pelas setas vermelhas.

Fig. 30: Cariótipo 47,XY,+mar.ish der(15)t(15;16) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado de uma translocação entre os cromossomos 15 e 16, de herança materna.

Fig. 31: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de centrômero do cromossomo 15.

Fig. 32: Cariótipo 47,XX,+r em bandeamento GTG, referente a paciente 9 da amostra. O cromossomo extranumerário em anel está indicado pela seta vermelha.

Fig. 33: Cariótipo 47,XY,+mar em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário não identificado pela técnica aplicada.

Fig. 34: À direita, metáfase parcial em bandeamento DAPI. A seta vermelha indica o cromossomo marcador em anel, revelando a presença de grande quantidade de heterocromatina e sugerindo a presença de duas regiões centroméricas. À esquerda, célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas WCPI4 (*spectrum orange*) e WCPI5 (*spectrum green*), evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais. Não foi observado sinal no cromossomo marcador em anel (seta vermelha), excluindo a origem dos cromossomos 14 e 15.

Fig. 35: Cariótipo 48,XX,+2mar em bandeamento GTG, referente à paciente 10 da amostra. Os cromossomos marcadores extranumerários estão indicados pela seta vermelha.

Fig. 36: Cariótipo 48,XY,+2mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 11 da amostra, pai da paciente 10. Os cromossomos marcadores extranumerários estão indicados pela seta vermelha.

Fig. 37: Cariótipos espectrais 48,XX,+2mar da paciente 10. A técnica não foi conclusiva, mas sugeriu origem dos cromossomos marcadores extranumerários como sendo dos cromossomos 5, 14 (a), 22 e Y (b), indicados pelas setas vermelhas.

Fig. 38: Cariótipos espectrais 48,XY,+2mar do paciente 11, pai da paciente 10. As imagens sugerem origem dos cromossomos marcadores extranumerários como sendo: (a) ambos dos cromossomos 22; (b) dos cromossomos 5 e 22, indicados pelas setas vermelhas.

Fig. 39: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas WCP22 (*spectrum orange*) e WCPY (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais e ausência de sinal verde, indicando a ausência de cromossomo Y. À esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais e um sinal verde referente ao cromossomo Y normal. As setas amarelas indicam os dois cromossomos marcadores extranumerários, com ausência de sinal para essas sondas, excluindo a origem dos cromossomos 22 e Y e evidenciando a presença de região centromérica.

Fig. 40: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCP5 (*spectrum orange*). À direita, metáfase da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 5 normais. À esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 5 normais. As setas amarelas indicam os dois cromossomos marcadores extranumerários, com ausência de sinal para essa sonda, excluindo a origem do cromossomo 5.

Fig. 41: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCPI4 (*spectrum orange*) e WCPI5 (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10 e à esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10. Em ambos observam-se dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais, dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos marcadores (setas amarelas), revelando origem de cromossomo 15.

Fig. 42: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10 e à esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10. Em ambos observam-se dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos marcadores (setas vermelhas), confirmando a presença de centrômero original do cromossomo 15.

Fig. 43: Esquema ilustrativo dos resultados finais. O ideograma à esquerda representa as bandas presentes nos cromossomos marcadores e as setas vermelhas indicam os pontos de quebra. Ao centro, os cromossomos marcadores em bandeamento DAPI e à direita, os marcadores em bandeamento GTG.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Pacientes selecionados para caracterização dos cromossomos marcadores.

Tabela II: Resultados dos cariótipos finais após a aplicação das técnicas de bandeamento GTG, SKY e FISH.

RESUMO

LAUS AC. **Caracterização Citogenética Molecular de Cromossomos Marcadores Extranumerários**. 2008. 143 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Rearranjos cromossômicos envolvendo a presença de cromossomos marcadores extranumerário são achados citogenéticos freqüentes em pacientes que apresentam deficiência mental, alterações de crescimento, dismorfias e/ou malformações. A presença desse material é responsável por trissomia ou tetrassomia parcial de determinadas regiões cromossômicas, causando quadros clínicos distintos e inespecíficos. A variabilidade fenotípica está relacionada principalmente com os diferentes graus de mosaicismo, os genes presentes na região adicional, o cromossomo de origem, entre outros fatores. Sendo assim, a caracterização desse material cromossômico é de importância fundamental para a determinação do prognóstico e do aconselhamento genético dos pacientes e suas famílias. O presente estudo teve como objetivo a análise de cromossomos marcadores extranumerários por meio de técnicas de citogenética convencional e molecular. Foram selecionados onze pacientes que são acompanhados pelo o Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, todos com diagnóstico citogenético convencional por bandeamentos GTG de cromossomo marcador extranumerário. Para determinação da origem e caracterização dos cromossomos marcadores foram aplicadas as técnicas de Cariótipo Espectral (SKY) e de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). Em dez pacientes foi possível determinar a origem e composição dos marcadores. Dois pacientes apresentam cromossomos marcadores identificados como duplicações invertidas do cromossomo 15, com cariótipos definidos, respectivamente, como 47,XY,+idic(15)(pter→q15::q15→pter) e 47,XX,+idic(15)(pter→q21::q21→p11.2), um

paciente possui cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15, com cariótipo 47,XX,+der(15)(pterq21) e dois pacientes, sendo uma menina e seu pai, possuem cromossomos marcadores derivativos do cromossomo 15 com cariótipos, respectivamente, 48,XX,+2der(15)(pterq12) e 48,XY,+2der(15)(pterq12). Dois pacientes possuem cromossomos marcadores derivativos do cromossomo 9, com cariótipos definidos, respectivamente, como 47,XX,+der(9)(pterq21) e 47,XX,+der(9)(pterq32) e um paciente apresenta cromossomo derivativo do cromossomo 4 [47,XX,+der(4)(p16q21)[9]/48,XX,+der(4)(p16q21),+mar[91]]. Um paciente possui um cromossomo marcador translocado derivativo do cromossomo 22 [47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2)] e outro paciente, um cromossomo translocado derivativo do cromossomo 15 [47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)], ambos herdados de mães portadoras de translocações aparente balanceadas. Em um caso, não foi possível a caracterização dos cromossomos marcadores por meio das técnicas aplicadas. Há uma grande variação fenotípica associada à presença de cromossomos marcadores e muitas vezes o prognóstico e o aconselhamento genético são difíceis de determinar. As técnicas de citogenética molecular são ferramentas importantes para a caracterização dos cromossomos marcadores, tanto durante o pré-natal, como para uma família que já possui um membro afetado, auxiliando no mapeamento gênico de cada região envolvida para futura correlação cariótipo-genótipo-fenótipo.

ABSTRACT

LAUS AC. **Molecular Cytogenetic Characterization of Supernumerary Marker Chromosomes.** 2008. 143 p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Chromosomal rearrangements involving supernumerary marker chromosomes are frequently found in patients with mental retardation, growth defects and malformations. The genetic materials presented in trisomy/tetrasomy are responsible by distinct and unspecific clinical symptoms. The phenotypic variation is related mainly to different mosaicism degrees, genetic content and chromosomal origin. Thus, the characterization of marker chromosomes is important to determine the prognosis and genetic counseling to the patients and their families. The aim of this study was to analyze supernumerary marker chromosomes using conventional and molecular cytogenetic techniques. Eleven patients were included in this study, all assisted in Medical Genetic Division of Clinical Hospital of School of Medicine of Ribeirão Preto – USP. They all presented supernumerary marker chromosomes detected by GTG band. The origin and composition were determined using Spectral Karyotype (SKY) and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) techniques. To ten patients, the origin and composition were determined. Two patients presented inverted duplications of chromosome 15, and their karyotypes were defined as 47,XY,+idic(15)(pter→q15::q15→pter) and 47,XX,+idic(15)(pter→q21::q21→p11.2), one patient had a derivative chromosome 15, with karyotype 47,XX,+der(15)(pterq21), and two patients, a girl and her father, had two derivatives chromosomes 15, with karyotypes 48,XX,+2der(15)(pterq12) e 48,XY,+2der(15)(pterq12), respectively. Two patients presented derivative chromosomes 9 and their karyotypes were defined as 47,XX,+der(9)(pterq21) and 47,XX,+der(9)(pterq32), and one patient had a derivative

chromosome 4, with karyotype 47,XX,+der(4)(p16q21)[9]/48,XX,+der(4)(p16q21),+mar[9]. One patient had a translocated marker chromosome, derivative 22, [47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2)] and another patient had a translocated marker chromosome, derivative 15 [47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)]. In one case, was not possible to define the origin and composition of the marker chromosome using SKY and FISH techniques. A large phenotypic variation is associated with supernumerary marker chromosomes and many times, the prognosis and genetic counseling is difficult to determine. The molecular cytogenetic techniques are important tools to its characterization, during prenatal diagnosis or to a family with an affected person, helping the genetic mapping of each region to a future correlation karyotype-genotype-phenotype.

Introdução

I.1. CROMOSSOMOS MARCADORES:

Os cromossomos marcadores são definidos como cromossomos estruturalmente anormais, os quais nenhuma região pode ser identificada (ISCN, 2005). Eles usualmente são extranumerários e assim, são definidos como um cromossomo adicional de origem e composição que não podem ser definidas pelas técnicas de citogenética convencional, como bandeamento GTG, CBG e Ag-NOR. Eles ocorrem em uma freqüência de 0,3/1000 nascidos vivos (BUCKTON et al., 1985) e com freqüência entre 0,4/1000 (WARBURTON, 1991) e 1,5/1000 (SACHS et al., 1987) em amostras para diagnóstico pré-natal. Ocorrem com uma freqüência de 2,77/1000 em fetos abortados (KUMAR et al., 1997), sendo que em pacientes com deficiência mental, a freqüência aumenta para 3,27/1000 (BUCKTON et al., 1985).

Aproximadamente 80% dos marcadores já descritos são de origem acrocêntrica (BUCKTON et al., 1985; SACHS et al., 1987; WARBURTON, 1991), sendo os mais freqüentes derivados do cromossomo 15 (60%) e do cromossomo 22. No entanto, cromossomos marcadores derivados de todos os pares cromossômicos já foram reportados anteriormente (CROLLA, 1998b; FRITZ et al., 2001).

A freqüência de associação entre cromossomos marcadores e fenótipo anormal varia entre 14,7% e 28,6% em portadores de cromossomos marcadores de origem não acrocêntrica e entre 7,1% e 10,9% em portadores de marcadores de origem acrocêntrica (WARBURTON, 1991; CROLLA, 1998b). Contudo, mesmo em portadores assintomáticos, os marcadores podem afetar a gametogênese, interferindo na segregação normal dos cromossomos homólogos ou promovendo trocas cromossômicas, e assim comprometendo a viabilidade da progênie (MARASCHIO et al., 1996).

Oitenta por cento dos cromossomos marcadores são de origem *de novo* (HOOK et al., 1983). Os 20% restantes têm origem familiar. Como regra geral, quando encontrados em pacientes fenotipicamente alterados, que herdaram o marcador de um dos pais com fenótipo

normal, são considerados como clinicamente insignificantes, podendo não estar relacionados com as alterações no fenótipo (HILLS et al., 2003). Aproximadamente 16% são de origem materna e 7% são herdados do pai, e essa origem parece não influenciar na gravidade do fenótipo da criança (LIEHR e WEISE, 2007). A origem familiar também pode estar associada à presença de translocações aparentemente balanceadas em um dos pais, no qual um erro na segregação meiótica resulta em um gameta com 24 cromossomos.

Os cromossomos marcadores formam um grupo morfológicamente heterogêneo de cromossomos estruturalmente anormais. Os estudos de caracterização dos cromossomos marcadores têm revelado vários tipos de alterações diferentes, entre elas: (1) cromossomos marcadores derivados de um único cromossomo; (2) cromossomos marcadores translocados, formados por material genético de dois ou mais cromossomos; (3) cromossomos isodicêntricos (duplicações invertidas); (4) cromossomos em anel; (5) cromossomos com neo-centrômeros.

1.1.1. Cromossomos Marcadores Derivados de um Único Cromossomo:

A formação dos cromossomos marcadores usualmente está associada a eventos de quebras cromossômicas, tanto durante a gametogênese, quanto durante as divisões mitóticas do embrião, e a não-disjunção meiótica. Além disso, dois mecanismos também foram comprovados como sendo responsáveis pela formação dos cromossomos marcadores. O **resgate de trissomia funcional**, no qual o zigoto foi originado de um gameta dissômico e um gameta normal, e no qual, partes de um dos cromossomos parentais (tanto o dissômico quanto o monossômico) são perdidos por uma ou duas quebras, durante um estágio inicial da divisão celular embrionária. Aqui, duas subclasses podem ser delineadas: (1) uma classe caracterizada por duas quebras nas regiões próximas ao centrômero, originando um cromossomo rico em heterocromatina, que resultaria em poucas alterações no fenótipo; (2)

outra classe caracterizada por uma ou duas quebras cromossômicas em regiões mais distais do centrômero e o qual, devido ao material eucromático envolvido, estaria relacionado a um fenótipo clinicamente relevante. Já a **complementação gamética**, envolve a fecundação entre um gameta dissômico e um gameta que carrega um cromossomo marcador, formado devido a quebras durante a gametogênese, originando assim um zigoto cromossomicamente alterado (KOTZOT, 2002b).

1.1.2. Cromossomos Marcadores Translocados:

Os cromossomos marcadores translocados são usualmente herdados de um dos pais que apresenta uma translocação balanceada, num processo de erro na segregação meiótica durante a formação dos gametas. Nesse processo, há formação da estrutura quadrivalente durante o pareamento dos cromossomos homólogos, sendo que um erro de segregação 3:1 do tipo aneuploidia terciária resulta em um gameta contendo apenas um cromossomo translocado e nenhum cromossomo normal, e um gameta contendo o dois cromossomos normais e o outro cromossomo translocado (GARDNER e SUTHERLAND, 2004). Caso esse segundo gameta seja fecundado, o resultado final no zigoto é a presença de um cromossomo translocado extranumerário, não identificado pelas técnicas de citogenética convencional e, portanto, classificado como cromossomo marcador (Fig. 1).

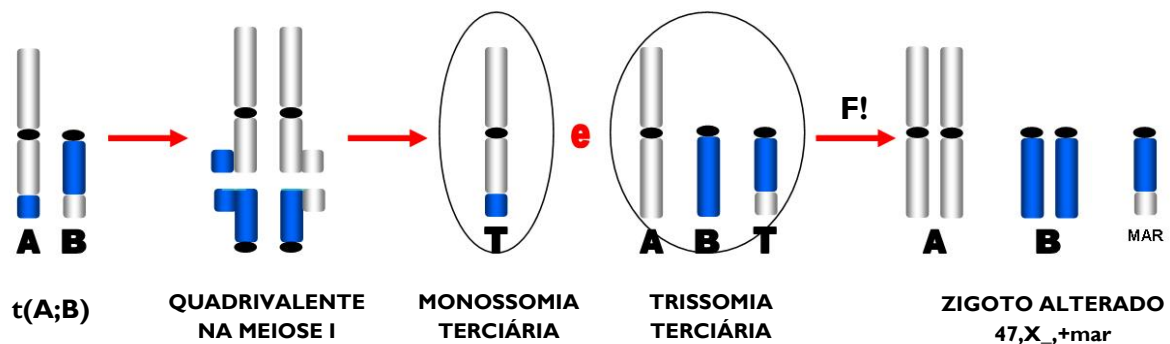


Fig. 1: Esquema ilustrativo da segregação meiótica em um portador de translocação aparentemente balanceada $t(A;B)$. Um erro de segregação do tipo 3:1 gera dois tipos de gameta, um deles contendo dois cromossomos normais (A e B) e um translocado (T). No caso de uma fecundação desse gameta, o zigoto formado apresentará um par cromossômico A normal, um par cromossômico B normal e um cromossomo marcador translocado (adaptado de Gardner e Sutherland, 2004).

1.1.3. Cromossomos Marcadores Isocromossomos e Isodicêntricos:

Os marcadores do tipo isocromossomos (i) e isodicêntricos (idic) correspondem a 52% dos cromossomos marcadores diagnosticados (<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm#Def>). Pouco se sabe sobre a formação de marcadores isocromossomos. Vários mecanismos já foram propostos, incluindo erro de divisão do centrômero, quebra e reunião de cromátides irmãs e trocas entre cromossomos homólogos. Estudos sobre a caracterização de $i(17p)$ em leucemias e meduloblastomas demonstraram que a maioria dos isocromossomos são, de fato, isodicêntricos (Pasquali et al., 1982; Scheurlen et al., 1999). O mecanismo mais plausível é a troca tipo U na meiose, resultante de erros durante o *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não-disjunção na meiose I. Nesse processo, ocorre a quebra em ambas as cromátides, mas a reunião dessas extremidades ocorre incorretamente, formando um cromossomo isodicêntrico e um fragmento acêntrico, que posteriormente pode ser perdido durante as divisões meióticas. O gameta formado em seguida contém um cromossomo normal e um

isodicêntrico, e se for fecundado, o zigoto resultante possuirá um cromossomo marcador extranumerário (Fig. 2).

Outra hipótese que explicaria a formação de isocromossomos e isodicêntricos é a fissão centromérica, que quebra o cromossomo duplicado durante as divisões mitóticas. Duas situações principais podem ocorrer: (1) a quebra pode acontecer no meio do centrômero, originando dois isocromossomos, um de braço curto e um de braço longo; (2) a quebra pode ocorrer na região proximal do centrômero, dando origem a um fragmento acêntrico e um isodicêntrico de braço curto ou de braço longo (Fig.3).

1.1.4. Cromossomos Marcadores em Anel:

Os cromossomos marcadores em anel ocorrem com uma frequência de 10% dos cromossomos marcadores diagnosticados, sendo que em 60% dos casos foram observadas alterações fenotípicas nos pacientes (Blennow et al., 1994; Blennow e Tillberg, 1996). Vários mecanismos para formação dos cromossomos marcadores em anel foram postulados e a grande maioria envolve a presença de uma segunda aberração cromossômica associada, principalmente deleções e duplicações invertidas. No entanto, o principal mecanismo que sugere a formação de um cromossomo em anel extranumerário sem nenhuma outra alteração associada, envolve a deleção de um fragmento de uma das cromátides irmãs de um par cromossômico durante a primeira divisão meiótica. Esse fragmento usualmente possui região centromérica e em seguida forma um anel. Ao final da meiose, os gametas formados podem conter: (1) um cromossomo normal; (2) um cromossomo deletado; (3) um cromossomo deletado e o anel ou (4) um cromossomo normal e o anel (Fig. 4). Esse último, se fecundado, resultaria em um zigoto com 47 cromossomos, sendo um cromossomo marcador extranumerário em anel.

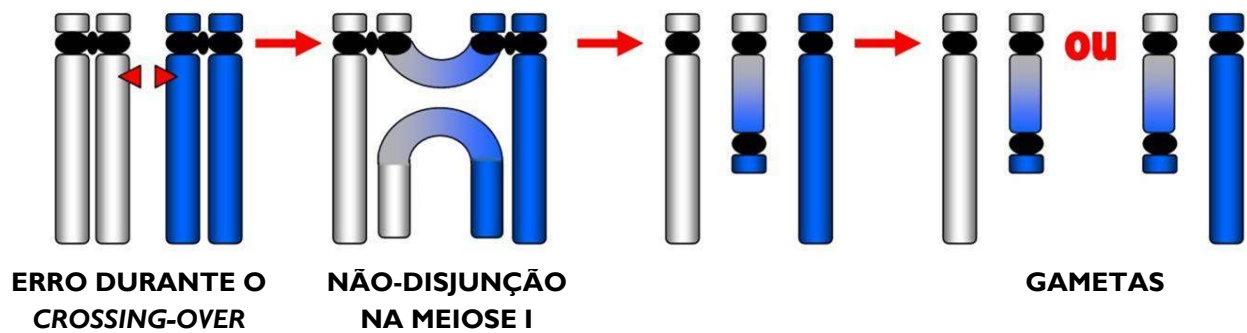


Fig. 2: Esquema ilustrativo da troca tipo U na meiose resultante de erros no *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não-disjunção na meiose I. A quebra ocorre corretamente, mas a reunião se dá incorretamente, formando um cromossomo isodivicêntrico e um fragmento acêntrico, que normalmente é perdido durante as divisões celulares subsequentes. A não-disjunção dos cromossomos homólogos durante a meiose I dá origem a gametas que contêm um cromossomo normal e o cromossomo alterado. O zigoto originado desses gametas possuirá um par cromossômico normal e um cromossomo marcador isodivicêntrico (adaptado de DEWALD, 1983).

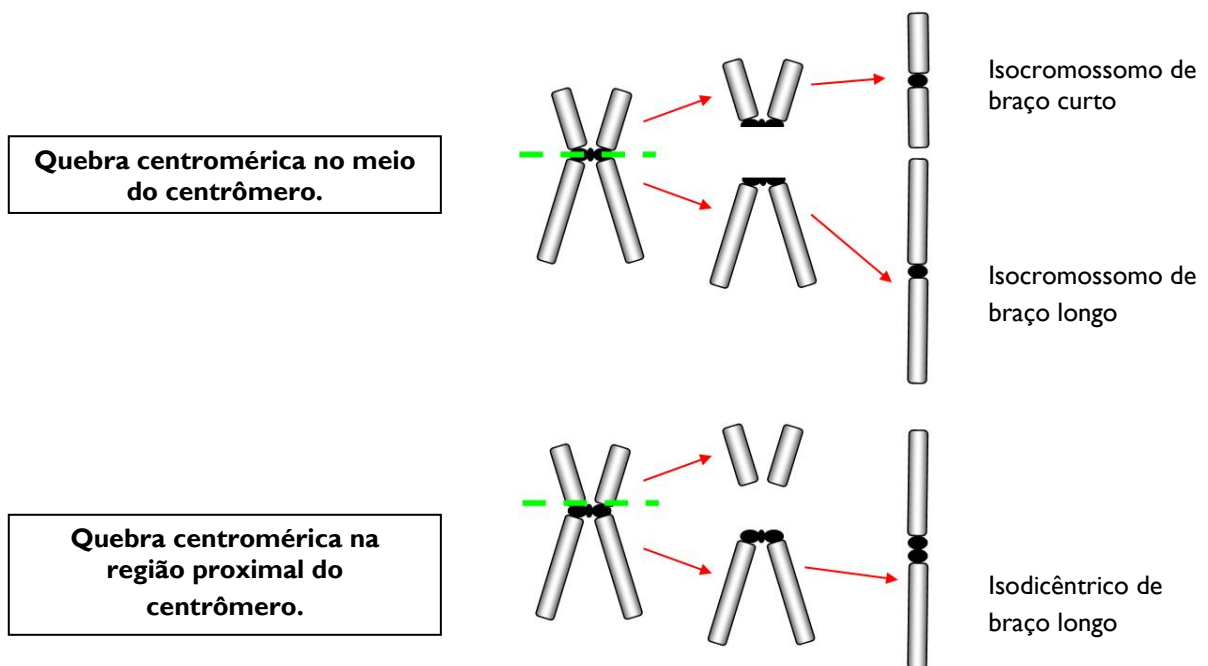


Fig. 3: Esquema ilustrativo da formação de um cromossomo isocromossomo e isodivicêntrico por fissão centromérica. Quando a fissão ocorre no meio do centrômero, ocorre formação de um isocromossomo de braço curto e um de braço longo. Quando a quebra ocorre na região proximal do centrômero, ocorre a formação de um fragmento acêntrico e um cromossomo isodivicêntrico (adaptado de DE LA CHAPELLE, 1982).

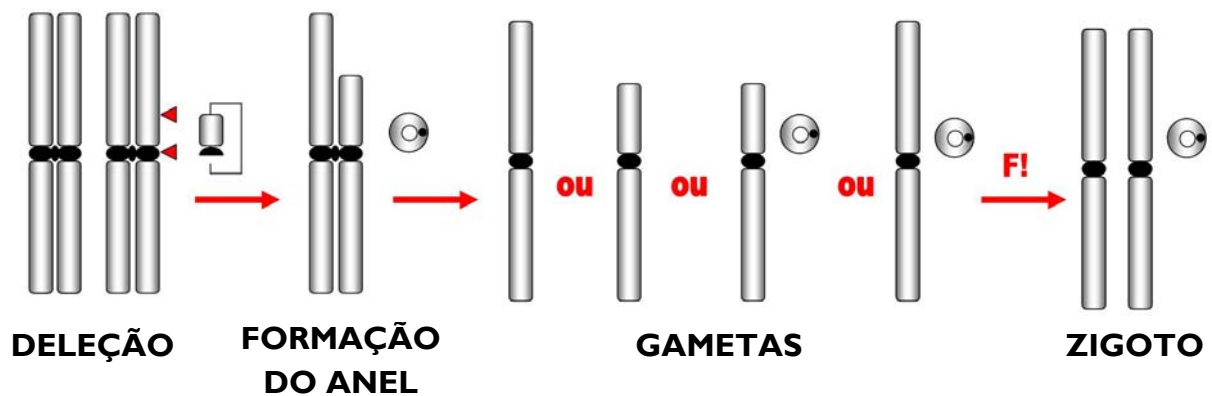


Fig. 4: Esquema ilustrativo da formação de um cromossomo marcador em anel. Uma quebra ocorre na região proximal ao centrômero de uma das cromátides-irmãs e esse fragmento forma um anel. Durante a meiose, o anel pode ser segregado com o cromossomo deletado ou com o cromossomo normal. No segundo caso, o zigoto formado após a fecundação possuirá um par de cromossomos normais e um cromossomo extranumerário em anel (adaptado de SCHUFFENHAUER, 1996).

1.1.5. Cromossomos Marcadores Isocromossomos com Neo-Centrômeros:

Os marcadores isocromossomos com neo-centrômeros ocorrem com uma frequência de 3,2% dos cromossomos marcadores diagnosticados (<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm#Def>). Os neo-centrômeros são regiões do genoma que não contém seqüências α -satélites (TYLER-SMITH et al., 1999), mas que são capazes de ancorar proteínas do cinetócoro, como HP-1, CENP-C e CENP-E (DEPINET et al., 1997) e assim, desempenham o mesmo papel dos centrômeros originais durante a divisão celular. Os neo-centrômeros se formam em regiões contendo seqüências que dividem alguma similaridade estrutural com a seqüência centromérica original, mas seus mecanismos de formação ainda não são totalmente compreendidos.

O desenvolvimento da maioria dos cromossomos marcadores com neo-centrômeros é baseada na troca tipo U na meiose, como no processo de formação dos cromossomos marcadores isodicêntricos, e a maior parte deles são isocromossomos (Fig. 5). O fragmento acêntrico formado durante esse processo é incluído em um gameta, um neo-centrômero é

ativado e um “novo” cromossomo é distribuído nas células filhas. Essa teoria baseia-se no fato de que a frequência de cromossomos inv dup(15) é similar àquela observada de cromossomos 15 com neo-centrômeros (DEPINET et al., 1997).

Os neo-centrômeros também são observados em cromossomos em anel, especialmente nos originados dos cromossomos 1, 2, 4 e 13. Uma região de um desses cromossomos é removida durante a meiose, por mecanismos e razões não conhecidas, e um neo-centrômero se forma no fragmento acêntrico, concomitante com a formação do anel. O centrômero original permanece no cromossomo deletado (SCHUFFENHAUER et al., 1996).

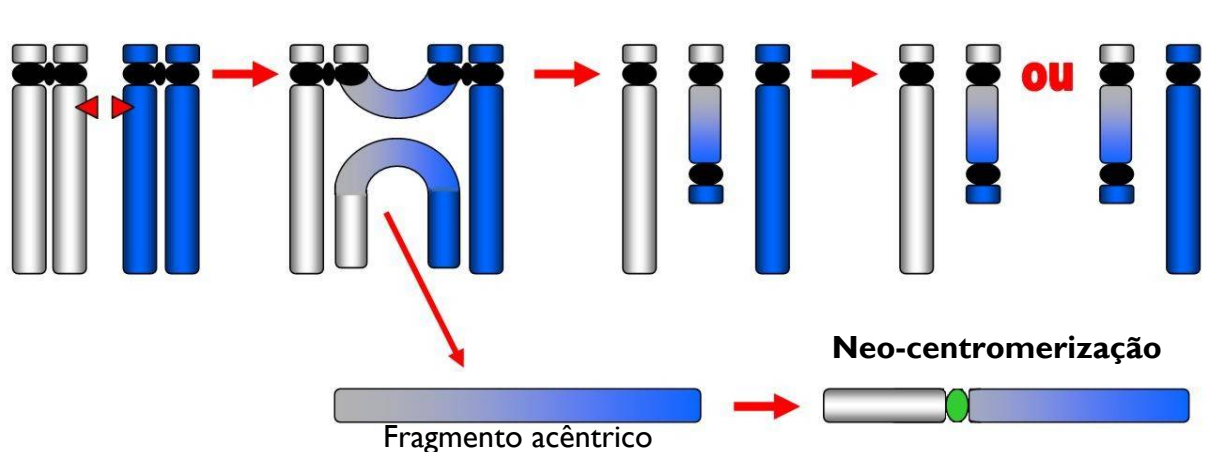


Fig. 5: Esquema ilustrativo da troca tipo U na meiose resultante de erros no *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não-disjunção na meiose I. Esse processo leva à formação de um fragmento acêntrico, que pode desenvolver um neo-centrômero, ser incluído num gameta e assim ser segregado para as células filhas (adaptado de DEWALD, 1983).

1.1.6. Associação entre Cromossomos Marcadores e Fenótipo:

Os fenótipos associados à presença de um cromossomo marcador variam enormemente, desde o normal até severamente alterado. As alterações podem envolver diferentes graus de deficiência mental, dismorfias e malformações e anomalias de órgãos internos, como coração, rins e órgãos genitais, entre outros. Essa variabilidade pode ser

explicada por diversos fatores, como diferentes graus de mosaicismo, conteúdo gênico da região adicional, cromossomo de origem e até mesmo a possibilidade de dissomia uniparental (FRITZ et al., 2001; MACKIE OGILVIE et al., 2001; STARKE et al., 2003b).

O mosaicismo é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um único indivíduo. De acordo com a literatura, entre 52,3 a 61,9% dos pacientes com cromossomos marcadores e fenótipo normal apresentam cariótipo em mosaico, enquanto que aproximadamente 56% dos pacientes com fenótipo anormal apresentam mosaicismo (WARBURTON, 1991; DANIEL e MALAFIEJ, 2003). Usualmente, é esperado que pacientes que apresentam mosaicismo com uma das linhagens celulares normal apresentem fenótipo menos severo que aqueles com 100% das células alteradas, dados baseados em relatos de casos familiares em que um dos pais apresenta mosaicismo com fenótipo normal e um filho herda o mesmo marcador em todas as células do organismo, mas apresenta alterações fenotípicas (VIERSBACH et al., 1998; ANDERLID et al., 2001).

O principal mecanismo de formação do mosaicismo é a não-disjunção mitótica durante as divisões celulares do embrião, e nos casos de cromossomos marcadores, esse processo é seguido por um ou dois eventos de quebra cromossômica em um dos cromossomos adicionais. No entanto, o mosaicismo também pode ser formado pelos mecanismos de resgate de trissomia funcional e complementação gamética. Nesses dois processos, a não-disjunção ocorre durante a meiose e a dissomia uniparental pode estar presente (KOTZOT, 2002a).

Outro aspecto que deve ser considerado em relação à variação fenotípica é a presença de dissomia uniparental dos cromossomos homólogos ao cromossomo marcador. Esta ocorre em aproximadamente 10% dos casos e se caracteriza pela presença de dois cromossomos homólogos herdados de um único progenitor (LIEHR et al., 2004a). Pouco se sabe sobre as implicações desse evento no fenótipo dos pacientes, mas nos casos de

cromossomos marcadores originados principalmente dos cromossomos 11 e 15, a dissomia uniparental deve ser considerada, devido a sua associação com o desenvolvimento das Síndromes de Beckwith-Wiedemann, Angelman e Prader-Willi (SHAFFER et al., 2001; NICHOLLS, 2000).

Os cromossomos marcadores originados do cromossomo 15 são os mais comuns, com uma frequência de aproximadamente 60% (CROLLA, 1998b; FRITZ et al., 2001). Muitos desses cromossomos são na verdade formados por duplicações invertidas que envolvem a região 15q11q13 (DONLON et al., 1986). A presença dessa aberração resulta em tetrassomia de todo braço curto e de parte do braço longo do cromossomo 15. Sua frequência foi estimada em 1/30.000 nascidos vivos (SCHINZEL e NIEDRIST, 2001). Dois tipos de cromossomos marcadores formados por inv dup(15) foram identificados e possuem fenótipos diferentes: os que não envolvem a região crítica das Síndromes de Prader-Willi e Angelman (PWS/AS) usualmente apresentando fenótipos normais e os que possuem essa região em tetrassomia e apresentam fenótipo alterado (CHENG et al, 1994; ROBINSON et al., 1993; BLENNOW et al., 1995). As alterações de fenótipo mais comuns são: comportamento autista, deficiência mental de moderada a severa, convulsões e epilepsia, hipotonia e dismorfias faciais, entre outras.

Os cromossomos marcadores abrangem um amplo espectro de quadros clínicos, mas três síndromes raras já foram associadas à presença de cromossomos marcadores específicos:

- Síndrome de Pallister-Killian (PKS) (PALLISTER et al., 1977; KILLIAN et al., 1981): é uma síndrome polimalformativa, que apresenta características faciais dismórficas, membros curtos, deficiência mental severa e epilepsia. Citogeneticamente, resulta da tetrassomia do braço curto do cromossomo 12, revelada em uma distribuição em mosaico de um marcador isocromossomo i(12p). O diagnóstico da PKS é difícil, pois a anomalia cromossômica

frequentemente não é detectada em linfócitos por métodos convencionais, exigindo investigação em fibroblastos e medula óssea (WARD et al., 1988; WENGER et al., 1990).

- Síndrome do olho do gato (*Cat Eye Syndrome – CES*): o fenótipo é muito variado, mas os critérios diagnósticos incluem coloboma ocular (de íris e/ou retina), atresia anal (com ou sem fístulas), fossetas pré-auriculares, defeitos cardíacos (principalmente retorno venoso pulmonar anômalo), hipertelorismo, fissuras palpebrais, defeitos urogenitais e deficiência mental (de leve à moderada) (SCHINZEL et al., 1981). Citogeneticamente, é caracterizada pela presença de cromossomo marcador derivado de uma duplicação invertida do braço curto e região proximal do braço longo do cromossomo 22 (inv dup22pter-22q11.2), que leva à tetrassomia dessa região (MCDERMID et al., 1986).

- Síndrome i(18p): é caracterizada por hipotonia, microcefalia, dificuldade para se alimentar, camptodactilia, rosto redondo, orelhas baixo implantadas, sobrancelhas altas, fissuras palpebrais curtas, nariz e boca pequenos, deficiência mental de moderada à grave, convulsões, espasmos e cardiopatia. Citogeneticamente, é caracterizada pela presença de marcador isocromossomo derivado do cromossomo 18 [i(18p)], que leva à tetrassomia do braço curto desse cromossomo (CALLEN et al., 1990).

1.1.7. Cromossomos Marcadores e Infertilidade:

Infertilidade é definida como a incapacidade de um casal de gerar uma criança após 12 meses de relações sexuais com frequência regular, sem a utilização de métodos contraceptivos. As causas da infertilidade são muitas, e podem envolver as malformações do sistema reprodutor, problemas hormonais e imunológicos, infecções sistêmicas e alterações citogenéticas. As aberrações cromossômicas são, de fato, importantes causas de infertilidade. Enquanto que aproximadamente 1% da população geral apresenta uma alteração cromossômica, em casais com abortamentos de repetição, essa frequência

umenta para 2,4% a 6,8% (CLEMENTINI et al., 2005). Quando presentes na linhagem germinativa, as aberrações podem ser transmitidas para os gametas e conseqüentemente para a progênie, ou até mesmo dificultar a meiose e levar à formação de gametas não balanceados (MAKINO et al., 1990; MCFADDEN e FRIEDMAN, 1997; GEKAS et al., 2003).

Os cromossomos marcadores estão presentes em aproximadamente 0,17% dos casais inférteis (LIEHR et al., 2006) e a presença dessa alteração pode levar à infertilidade tanto em homens quanto mulheres (BUCKTON et al., 1985; MARTIN-LUCAS et al., 1986), principalmente por modificar o pareamento dos cromossomos e formar gametas não balanceados. Alguns estudos relatam a ocorrência de oligo ou azoospermia em homens inférteis ou sub-férteis que apresentam cromossomo marcador, especialmente originado do cromossomo 15. (MARTIN-LUCAS et al., 1986; MANENTI, 1992; GENTILI et al., 1993). Já em homens férteis portadores dessa aberração, análises meióticas em espermatozóides revelaram segregação 1:1 do cromossomo marcador (MARTIN et al., 1986; MENNICKE et al., 1997).

Mesmo em casais citogeneticamente normais, após o estabelecimento da gesta o, o aparecimento do cromossomo marcador no feto pode causar abortos espontâneos de repeti o. Além disso, a detec o dessa aberra o durante os exames pré-natais   um grande problema para o aconselhamento genético do casal, devido   grande variabilidade fenotípica associada   sua presença, sendo praticamente impossível prever se haverá e quais serão as conseq ncias fenotípicas para o recém-nascido.

1.2. CITOGENÉTICA MOLECULAR:

Muitas altera es fenotípicas e do desenvolvimento, como deficiência mental, dismorfias e malforma es, são associadas a aberra es cromossômicas. A defini o da etiologia da malforma o deve incluir, entre outros, a caracteriza o da aberra o e dos

cromossomos envolvidos. Nos casos de cromossomos marcadores, não é possível estabelecer uma relação precisa entre cariótipo e fenótipo e assim, a caracterização de cada cromossomo marcador torna-se imperativa para esta correlação (STARKE et al., 2003b).

Esta caracterização deve incluir alguns passos essenciais, que envolvem várias técnicas de citogenética convencional e molecular. Inicialmente, a detecção do cromossomo marcador é feita por bandeamento GTG, que revela sua morfologia e estrutura, assim como outro tipo de aberração cromossômica no paciente ou em seus pais. A análise convencional detecta também a presença de mosaicismos cromossômicos e a porcentagem de cada linhagem celular. A aplicação da técnica de bandeamento CBG é fundamental para determinar a presença de centrômero e o bandeamento Ag-NOR indica se a origem é de cromossomo acrocêntrico, ambas as informações importantes para sua caracterização.

Uma grande variedade de técnicas de citogenética molecular pode então ser aplicada para caracterização mais precisa do cromossomo marcador. Por muitos anos, a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi amplamente utilizada com o intuito de determinar a origem dos cromossomos marcadores. Atualmente, as técnicas de Hibridação *in situ* Fluorescente Multicolor, genericamente chamadas M-FISH, são as mais utilizadas, porque permitem identificar cada par cromossômico diferencialmente em um único experimento e sem um conhecimento prévio das regiões envolvidas (BEATTY et al., 2002).

Já o mapeamento das regiões presentes no marcador pode ser realizado pelas técnicas de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH), Hibridação Genômica Comparativa (CGH) e Hibridação Genômica Comparativa em Array (CGH-Array).

1.2.1. Técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente – FISH:

A inclusão da técnica de FISH na citogenética clínica aumentou as possibilidades de análise de aberrações cromossômicas envolvidas em doenças humanas e câncer. Assim,

sondas específicas e protocolos para diagnóstico dessas alterações são amplamente utilizados em avaliações pré-natais, definição do diagnóstico sindrômico e marcadores tumor-específicos. A FISH tornou possível o diagnóstico de inúmeras aberrações e a determinação da origem dos cromossomos envolvidos, não detectadas por meio de análise citogenética convencional. A FISH é uma ferramenta importante para determinação dos pontos de quebra em rearranjos estruturais, como translocações, inversões e material adicional, e também de cromossomos marcadores (BEATTY et al., 2002).

Desenvolvida em 1981 por LANGER e colaboradores e aplicada ao estudo de cromossomos humanos pela primeira vez em 1986 (PINKEL et al., 1986), o método de FISH consiste no anelamento específico entre uma sonda de oligonucleotídeos com marcação fluorescente e seqüências de ácido nucléico pertencentes à amostra analisada. Possibilita a detecção de seqüências específicas de DNA e RNA em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos (BEATTY et al., 2002). Essa técnica permite que seqüências alvo de DNA possam ser localizadas e que o genoma inteiro de uma espécie, cromossomos inteiros, sub-regiões cromossômicas ou seqüências de cópia única possam ser avaliados, dependendo da complexidade da sonda usada e da combinação de seqüências específicas (TRASK, 1991).

Todos os tipos de seqüências de DNA humano podem ser utilizados como sonda. Estas incluem: seqüências únicas, seqüência de DNA repetitivo (α -satélite e telômero), seqüências loco-específica obtida por amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), grandes seqüências de DNA genômico clonadas em cosmídeos, em cromossomos artificiais de bactérias (BACs), em cromossomos artificiais de fago (PACs) e em cromossomos artificiais de levedura (YACs), bandas cromossômicas, seqüências braço específicas e cromossomos inteiros geradas por microdissecção (FAN, 2002). Essas sondas apresentam regiões alvo-específicas, que não são repetidas no genoma, possibilitando a detecção de ploidias, translocações e seus pontos de quebra, identificação de síndromes de

microdeleção, amplificação gênica, seqüências únicas e mapeamento físico dos cromossomos (GERSEN e KEAGLE, 1999).

As seqüências de DNA satélite consistem em seqüências repetidas de DNA genômico que não codificam produtos gênicos. Diferentes tipos de DNA satélite já foram identificados, entre elas, a família de DNA α -satélite, que compõe os centrômeros. É uma seqüência monomérica repetida *in tandem* de 171pb, estendendo-se de 250 a 4000kb. Esse DNA satélite constitui em média 1 a 5% de cada cromossomo humano, sendo a maior parte igual entre os cromossomos. No entanto, 2 a 3% apresentam variação suficiente para diferenciar o centrômero de um cromossomo do outro, e assim é possível a produção de sondas de DNA α -satélite que permitem distinguir praticamente todos os centrômeros dos cromossomos humanos, com exceção dos pares 13 e 21 e 14 e 22 (CHOO, 1997). Outra família de DNA satélite é a que constitui as regiões terminais de todas as moléculas de DNA humano, sendo informativo nos estudos de microdeleções e translocações subteloméricas crípticas, presentes no cariótipo de aproximadamente 10% dos portadores de deficiência mental idiopática (BIESECKER et al., 1995; LIEHR e CLAUSSEN, 2002).

Sondas de cromossomos inteiros (WCP – *whole chromosome painting*) são constituídas de uma combinação de várias seqüências nucleotídicas únicas e DNA repetitivo. Podem ser obtidas principalmente por microdissecção de cromossomos numa preparação metafásica, seguida pela amplificação por PCR. Sondas WCP de todos os cromossomos humanos podem ser utilizadas para determinar a composição de cromossomos marcadores, detectar translocações crípticas, elucidar rearranjos complexos, entre outros (TRASK, 1991; SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 2000).

A técnica de FISH pode também ser utilizada para validação dos dados obtidos pelas técnicas de SKY, CGH e CGH-Array, e para confirmação de pontos de quebra, devido a sua alta especificidade.

1.2.2. Técnica de Cariótipo Espectral – SKY:

Para a aplicação da FISH é necessário um conhecimento prévio da região envolvida na aberração cromossômica, além da obtenção de sondas específicas para detecção da anormalidade, além de permitir a visualização de poucos cromossomos em um único experimento. O surgimento da técnica de SKY sobrepôs essas limitações e consiste de uma combinação de microscopia óptica, imagem de alta resolução e emissão espectral por espectroscopia Fourier. Esse método permite a observação dos 24 cromossomos em um único procedimento, através da utilização de um coquetel único de sondas cromossômicas, que marcam diferencialmente e identificam cada par cromossômico. Esse coquetel é constituído de uma mistura de 5 fluorocromos com espectros distintos: *rhodamine*, *Spectrum-Orange*, *Texas Red*, *Cy5* e *Cy5.5*. A combinação desses fluorocromos permite que cada cromossomo tenha uma assinatura espectral única. A aquisição das imagens é realizada em microscópio de epifluorescência, acoplado a um filtro triplo especial (SKY CUBE[®], Applied Spectral Imaging) e um interferômetro, onde são geradas aproximadamente 100 quadros de uma mesma imagem, diferentes entre si pela trajetória óptica. A imagem espectral gerada é analisada pelo *software* SD 200 Spectral Bio-Imaging System (ASI Ltda., Israel) e um segundo *software*, SKYVIEW[®], compara esses espectros com uma biblioteca contendo combinações de cada fluorocromo para cada cromossomo, gerando uma imagem classificatória (BAYANI e SQUIRE, 2001; BAYANI e SQUIRE, 2002).

A técnica de SKY tem sido utilizada com sucesso para detectar aberrações estruturais não diagnosticadas por métodos de citogenética convencional e por FISH, principalmente translocações e origem de cromossomos marcadores. Esse método, no entanto, não é capaz de detectar alterações intracromossômicas, como deleções, duplicações e inversões e o limite mínimo de um segmento cromossômico para ser detectado pela técnica é de 1 a 2 Mb (FAN et al., 2000). Regiões centroméricas e teloméricas também têm sua caracterização

comprometida, principalmente devido à utilização de COTI-DNA, que inibe a hibridação de DNA repetitivo (LIEHR e CLAUSSEN, 2002).

1.2.3. Técnica de Hibridação Genômica Comparativa – CGH:

A técnica de CGH foi primeiramente descrita por KALLIONIEMI e colaboradores em 1992. Ela consiste na marcação do DNA teste com um fluorocromo verde, que é misturado em uma razão de 1:1 com DNA normal marcado com um fluorocromo vermelho. Ambos são hibridados em preparações metafásicas humanas normais (lâmina controle). O DNA normal e as metáfases são obtidos de um voluntário saudável. Os fragmentos de DNA marcados em verde e vermelho competem pela hibridação em seus *loci* de origem na preparação metafásica. A proporção de fluorescência verde e vermelha medida ao longo do eixo cromossômico representa perda (razão < 0,8) ou ganho (razão > 1,2) de material genético naquela região específica (KALLIONIEMI et al., 1992).

Essa técnica é capaz de detectar apenas deleções e ampliações, sendo que alterações estruturais, como translocações e inversões não são observadas. Sua resolução é de 5 a 10Mb para deleções e 2Mb para ampliações (MANTRIPRAGADA et al., 2004).

1.2.4. Técnica de Hibridação Genômica Comparativa em Array (CGH-Array):

A técnica de CGH-Array é baseada nos mesmos princípios da técnica de CGH. A diferença essencial está na plataforma usada para a hibridação dos DNA teste e DNA normal marcados. Enquanto a técnica de CGH é realizada em células metafásicas, no CGH-Array a hibridação é feita em uma placa ou lâmina formada por vários pontos contendo cada um deles um clone genômico de interesse, usualmente obtidos a partir de BACs, PACs e cosmídeos (MANTRIPRAGADA et al., 2004). Uma vez que esses clones são usados como DNA alvo, a resolução da técnica varia de acordo com o tamanho dos clones e alterações

muito sutis podem ser identificadas (ISHKANIAN et al., 2004). A região cromossômica a ser analisada é diferente para cada experimento e as seqüências aplicadas na lâmina devem ser escolhidas apropriadamente, de acordo com dados preliminares de cada caso. Assim, uma grande variedade de plataformas pode ser utilizada, como por exemplo, as que contêm seqüências que cobrem um cromossomo inteiro, as plataformas que cobrem todo o genoma, plataformas para detecção de polimorfismos de cópia única (SNPs) e de variação de número de cópias (CNVs), entre outros.

Objetivos

O presente estudo tem como objetivos:

(1) Identificar a origem dos cromossomos marcadores, associando técnicas de citogenética convencional à citogenética molecular (FISH e SKY);

(2) Determinar as regiões em trissomia ou tetrassomia parcial presentes nos cromossomos marcadores através da aplicação da técnica de FISH e por observação dos pontos de quebra utilizando-se os resultados de bandeamento GTG;

(3) Estabelecer a correlação entre cariótipo e fenótipo dos pacientes para orientação do prognóstico e aconselhamento genético para suas famílias.

Material e Métodos

3.1. CASUÍSTICA:

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular (Grupo de Genética Reprodutiva) do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMRP - USP (Anexo I) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Brasília-DF (Anexo II). Todos os pacientes e/ou responsáveis participantes do estudo autorizaram o uso das amostras para análise laboratorial e publicação dos resultados mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

Os pacientes avaliados neste trabalho são acompanhados pelo setor de Genética Médica do HCFMRP – USP. O principal critério para inclusão dos pacientes no estudo foi o resultado de cariótipo positivo para cromossomo marcador extranumerário. Esse exame é realizado rotineiramente nos pacientes atendidos no Ambulatório de Genética Médica do HCFMRP – USP e o levantamento dos pacientes foi realizado nos arquivos digitais do Laboratório de Citogenética do HCFMRP – USP. Após a seleção, os pacientes foram avaliados no Ambulatório de Genética Médica com a colaboração dos médicos residentes e contratados e os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. Os resumos dos achados clínicos estão sumarizados no Anexo IV.

Foram selecionados onze pacientes com cromossomo marcador, dentre eles, nove crianças entre 11 meses e 15 anos, e dois adultos com 26 e 35 anos. Sete eram casos isolados, cujos pais apresentaram cariótipos normais. Três casos familiares foram selecionados:

- um menino, com fenótipo alterado, com cariótipo 47,XY,+mar e sua mãe, com fenótipo normal e portadora de translocação aparentemente balanceada 46,XX,t(11;22).

- um menino, com fenótipo alterado, com cariótipo 47,XY,+mar e sua mãe, com fenótipo normal e portadora de translocação aparentemente balanceada 46,XX,t(15;16);
- uma menina, com fenótipo normal, e seu pai, também com fenótipo normal, com cariótipos, respectivamente, 48,XX,+2mar e 48,XY,+2mar;

A tabela I resume a amostra selecionada para realização deste trabalho.

Tabela I: Pacientes selecionados para caracterização dos cromossomos marcadores.

Paciente	Idade	Sexo	Cariótipo
1	26 anos	M	47,XY,+mar[72]/46,XY[28]
2	15 anos	F	47,XX,+mar
3	13 anos	F	47,XX,+mar
4	7 anos	F	47,XX,+mar[9]/48,XX,+2mar[91]
5	15 anos	F	47,XX,+mar
6	5 anos	M	47,XY,+mar
7	4 anos	F	47,XX,+mar
8	11 meses	M	47,XY,+mar
9	5 anos	F	47,XX,+r[24]/ 46,XX,+ace[3]/46,XX[73]
10	1 ano	F	48,XX,+2mar
11	35 anos	M	48,XY,+2mar

Legenda: “F”: feminino; “M”: masculino; “mar”: marcador; “ace”: acêntrico; “r”: ring (anel)

3.2. MATERIAL:

De todos os pacientes foi retirada uma amostra de sangue periférico em tubo Vacutainer de 5mL contendo heparina sódica, que foi destinada à cultura temporária de linfócitos para obtenção de células metafásicas e núcleos interfásicos.

3.3. METODOLOGIA:

Cultura Temporária de Linfócitos (MOORHEAD *et al.*, 1960, modificada):

O sangue foi cultivado em meio RPMI 1640 (GIBCO) com L-glutamina, suplementado com fitohemaglutinina, estreptomicina, penicilina e soro bovino fetal, em estufa a 37°C e após 71 horas e meia foi adicionado 0,1 mL de colchicina a 0,0016%, sendo as células bloqueadas na fase de metáfase da divisão celular. Após meia hora, foi realizada centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi então incubado por 10 minutos em banho-maria. Adicionaram-se algumas gotas de solução Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) para bloquear a ação da solução hipotônica e após homogeneização, foi realizada centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e iniciou-se então a fase de fixação do material com adição de 5 mL de solução Carnoy. O material foi homogeneizado e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. A suspensão celular foi armazenada em tubos cônicos a -20°C.

Coloração convencional:

As lâminas foram preparadas a partir da suspensão celular obtida através da cultura temporária de linfócitos descrita acima. Uma gota do material foi pingada em cada lâmina e

esta corada por 5 minutos com Giemsa em tampão fosfato 0,06M pH=6,8 (1:30) e lavadas com água corrente.

Foram analisadas 100 metáfases de cada paciente para determinação do número total de cromossomos e para exclusão de mosaicismo, em nível de 3% (Hook et al., 1983).

Bandamento GTG (SCHERES, 1972):

As lâminas foram preparadas a partir de suspensão celular obtidas de cultura temporária de linfócitos. Uma ou duas gotas do material foram pingadas em cada lâmina e mantidas a temperatura ambiente por um período de 3 a 15 dias, variando com as condições ambientais de temperatura e umidade.

As lâminas foram então mergulhadas em tripsina 0,1% por 1 a 20 segundos, dependendo do tempo de envelhecimento. Neutralizou-se com água destilada e em seguida, foram coradas com Giemsa, por 10 minutos.

Foram analisadas vinte metáfases de cada paciente para determinação de possíveis alterações estruturais e definição da origem de cromossomos extranumerários.

A análise microscópica foi realizada em microscópio Axiophoto (Zeiss), objetiva PlanApo100x, acoplado a sistema computadorizado de análise MetaSystem, utilizando o software IKARO para documentação dos resultados.

Cariótipo Espectral - SKY:

A técnica de SKY foi aplicada às amostras de todos os pacientes.

As lâminas contendo duas gotas de suspensão celular foram deixadas em temperatura ambiente por três dias para envelhecimento. Em seguida, foram deixadas em solução 10% pepsina/0,01M HCl a 37°C durante 7 minutos e depois imersas duas vezes em solução de 1xPBS, em temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em solução

1xPBS/MgCl₂ em temperatura ambiente por 5 minutos e em solução 37% formaldeído/PBS/MgCl₂, em temperatura ambiente por 10 minutos. As lâminas foram lavadas novamente em 1xPBS em temperatura ambiente por 5 minutos e então desidratadas em uma série de etanol 70%, 85% e 100%, em temperatura ambiente, por 3 minutos cada, e deixadas para secar.

Para denaturação dos cromossomos, as lâminas foram colocadas em solução 70% formamida/2xSSC, a 72°C, por dois minutos. Em seguida, desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% gelados, por 2 minutos cada, e deixadas para secar a temperatura ambiente. O coquetel de sondas da empresa Applied Spectral Imaging (ASI Ltda., Israel) foi utilizado para esse procedimento. A denaturação de 10µL desse coquetel [Spectral Karyotyping Reagent (vial #1)] para cada lâmina foi realizada a 75°C por 7 minutos em banho-maria. Em seguida foi deixado a 37°C por uma hora. O coquetel de sondas denaturado foi então aplicado às lâminas e essas deixadas para hibridação em câmara úmida e escura, a 37°C, por um tempo entre 48 e 52 horas.

Seguiram-se então as lavagens pós-hibridação. As lâminas foram lavadas três vezes em solução 50% formamida/2xSSC a 45°C, por 5 minutos cada. Em seguida, em solução 1xSSC, a 45°C, por 5 minutos, duas vezes e depois em solução 4xSSC/0,1% tween 20, a 45°C por 2 minutos. Foram aplicados 80µL de blocking reagent (vial #2) e as lâminas deixadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 80µL de Cy5 Staining Reagent (vial #3) e deixada em estufa a 37°C por 45 minutos. As lâminas foram lavadas em solução 4xSSC/0,1% tween 20, a 45°C por 5 minutos, três vezes. Foram aplicados 80µL de Cy5.5 Staining Reagent (vial #4) e novamente deixadas em estufa a 37°C por 45 minutos. Foram repetidas as lavagens com 4xSSC/0,1% tween 20 e então, aplicados 20µL de DAPI/antifade (vial #5) em cada lâmina.

As imagens das metáfases foram obtidas através do uso de microscópio Olympus BX-40, acoplado a sistema computadorizado Spectral Imaging-Multi Color Karyotyping, Spectral Karyotyping e analisadas com auxílio dos *softwares* SD 200 Spectral Bio-Imaging System e SKYView[®] EXPO (ASI Ltda., Israel). Foram analisadas entre 11 e 40 metáfases por paciente, sendo escolhidas as que apresentaram melhor qualidade da hibridação, baixo nível de sinais não específicos, bom espalhamento dos cromossomos nas metáfases, com pouca ou nenhuma sobreposição e boa resolução do bandeamento DAPI para identificação dos cromossomos.

Essa metodologia foi realizada no Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Genética da USP, em colaboração com o Serviço de Oncologia Pediátrica do HCFMRP – USP.

Hibridação *in situ* Fluorescente - FISH:

Para realização da técnica de FISH, foram utilizadas sondas comerciais WCP (*Whole Chromosome Painting*), centroméricas (CEP) e teloméricas (TEL) (Vysis Inc., USA e Cytocell, UK). Todos os resultados foram obtidos utilizando-se microscópio Olympus BX-40, acoplado a sistema computadorizado de análise e analisadas com auxílio do *software* FISHView[®] EXPO (ASI Ltda., Israel). Foram analisadas aproximadamente 11 metáfases por experimento.

Sondas WCP22 e WCPY (Vysis Inc., USA):

A técnica de FISH com a sonda WCP22 foi aplicada às amostras dos pacientes 6, 10 e 11, e com a sonda WCPY, foi realizado nos pacientes 10 e 11.

As lâminas, contendo duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas três dias para envelhecer. Foram então lavadas em 1xPBS, em

temperatura ambiente, por 30 segundos, duas vezes. Em seguidas, foram lavadas em ddH₂O, em temperatura ambiente, por 30 segundos, duas vezes. Foram então desidratadas em etanol 70%, 80% e 100% em temperatura ambiente, 2 minutos cada, e deixadas para secar. A denaturação foi realizada em solução 70% formamida/2xSSC em banho-maria a 73°C por 5 minutos. Em seguida, foram novamente desidratadas em etanol 70%, 80% e 100% a -20°C, 2 minutos cada e deixadas para secar em temperatura ambiente. A sonda foi preparada adicionando 3µL de sonda e 7µL de tampão e então denaturada em banho-maria a 73°C por 5 minutos. A sonda foi então aplicada à lâmina, selada e deixada para hibridar em câmara úmida e escura a 37°C aproximadamente 16 horas.

Após o período de hibridação, as lâminas foram lavadas em solução 50% formamida/2xSSC, a 46°C, por 5 minutos, três vezes. Em seguida, deixadas em solução 2xSSC a 46°C, por 10 minutos e em solução 2xSSC/0,1% NP-40, em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram aplicados 20µL de DAPI/antifade.

Sonda WCP5, WCPI4 e WCPI5 (Cytocell, UK):

O FISH com a sonda WCP5 foi realizado nas amostras dos pacientes 10 e 11, com a sonda WCP 14 e WCPI5, nos pacientes 9, 10 e 11.

As lâminas, contendo duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas três dias para envelhecer. Foram então lavadas em solução 2xSSC, em temperatura ambiente, por 2 minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol 70%, 85% e 100%, em temperatura ambiente, por 2 minutos cada e deixadas para secar. A denaturação foi então realizada em 70% formamida/2xSSC a 73°C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% a -20°C, por 2 minutos cada e deixadas para secar. Foram utilizados 7µL de sonda por lâmina, denaturada em banho-maria a 75°C

por 5 minutos. A sonda foi aplicada, coberta por lamínula e selada. A hibridação ocorreu em câmara úmida e escura a 37°C por um período de 14 a 16 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas em solução 0,4xSSC a 72°C por 2 minutos e em solução 2xSSC/0,05% tween20, em temperatura ambiente, por 30 segundos. Foram aplicados 10µL de DAPI/antifade.

Sondas teloméricas TEL4p e TEL4q (Cytocell, UK):

O FISH com as sondas TEL4p e TEL4q foi aplicado às amostras da paciente 4.

As lâminas, contendo duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas três dias para envelhecer. Foram então lavadas em solução 2xSSC, em temperatura ambiente, por 2 minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol 70%, 80% e 95%, em temperatura ambiente, por 2 minutos cada e deixadas para secar. A denaturação foi então realizada em 70% formamida/2xSSC a 73°C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% a -20°C, por 2 minutos cada e deixadas para secar. A sonda foi preparada adicionando 3µL de sonda tel4p, 3µL de sonda tel4q e 4µL de tampão e denaturada em banho-maria a 75°C por 5 minutos. A hibridação ocorreu em câmara úmida e escura a 37°C por um período de 14 a 16 horas.

Após o período de hibridação, as lâminas foram lavadas em solução 50% formamida/2xSSC, a 46°C, por 5 minutos, três vezes. Em seguida, deixadas em solução 2xSSC a 46°C, por 10 minutos e em solução 2xSSC/0,1% NP-40, em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram aplicados 20µL de DAPI/antifade.

Sondas centroméricas CEP9 e CEP15 (Cytocell, UK):

O FISH com sonda CEP9 foi realizado nos pacientes 2 e 3, e com a sonda CEP15, nos pacientes 1, 5, 7, 8, 10 e 11.

As lâminas, contendo duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas três dias para envelhecer. Foram então lavadas em solução 2xSSC, em temperatura ambiente, por 2 minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol 70%, 80% e 95%, em temperatura ambiente, por 2 minutos cada e deixadas para secar. A denaturação foi então realizada em 70% formamida/2xSSC a 73°C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% a -20°C, por 2 minutos cada e deixadas para secar. A sonda foi preparada adicionando 3µL de sonda e 7µL de tampão e denaturada em banho-maria a 75°C por 5 minutos. A hibridação ocorreu em câmara úmida e escura a 37°C por um período de 14 a 16 horas.

Após o período de hibridação, as lâminas foram lavadas em solução 50% formamida/2xSSC, a 46°C, por 5 minutos, três vezes. Em seguida, deixadas em solução 2xSSC a 46°C, por 10 minutos e em solução 2xSSC/0,1% NP-40, em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram aplicados 20µL de DAPI/antifade.

Resultados

Os resultados dos cariótipos obtidos por bandeamento GTG e o diagnóstico citogenético obtido pelas técnicas de SKY e FISH serão apresentados separados por paciente.

Paciente I: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XY,+mar[72]/46,XY[28] (fig. 6) e cariótipo normal para ambos os pais. O estudo citogenético molecular por meio da técnica de SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15 (fig. 7), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XY,+mar.ish der(15)[72]/46,XY[28](SKY). Em seguida, foi realizada a técnica de FISH com a sonda CEP15 (*spectrum green*) (Cytocell, UK) para validação do resultado da técnica de SKY e confirmação da presença de região centromérica original do cromossomo 15. Foram observados quatro sinais verdes, dois referentes aos centrômeros do par cromossômico 15 normal e dois sinais no cromossomo marcador, indicando a presença de duas regiões centroméricas, sugerindo se tratar de um cromossomo isodicêntrico e confirmando os resultados obtidos na técnica de SKY (fig. 8). O cariótipo definitivo foi 47,XY,+idic(15)(pter→q15::q15→pter)[72]/46,XY[28].

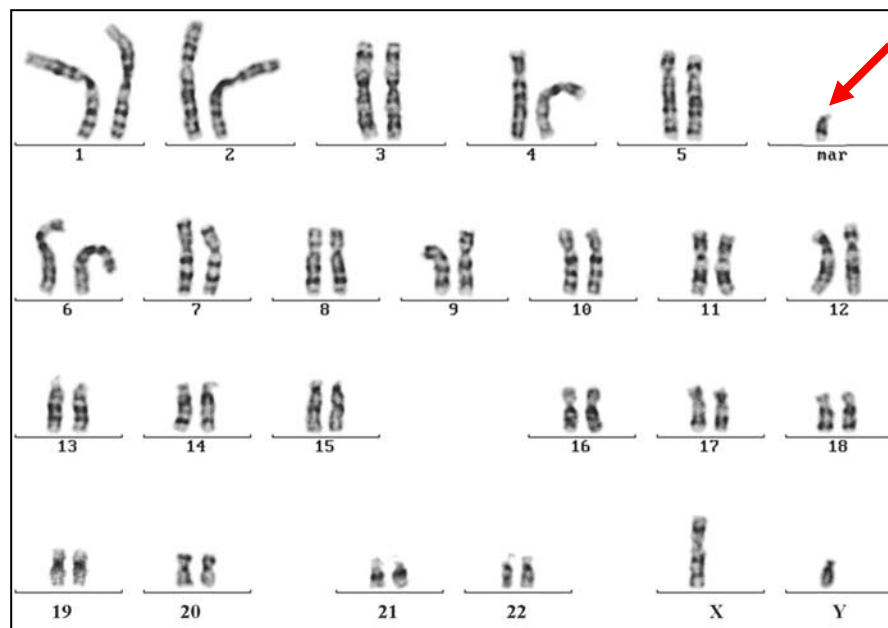


Fig. 6: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente I da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

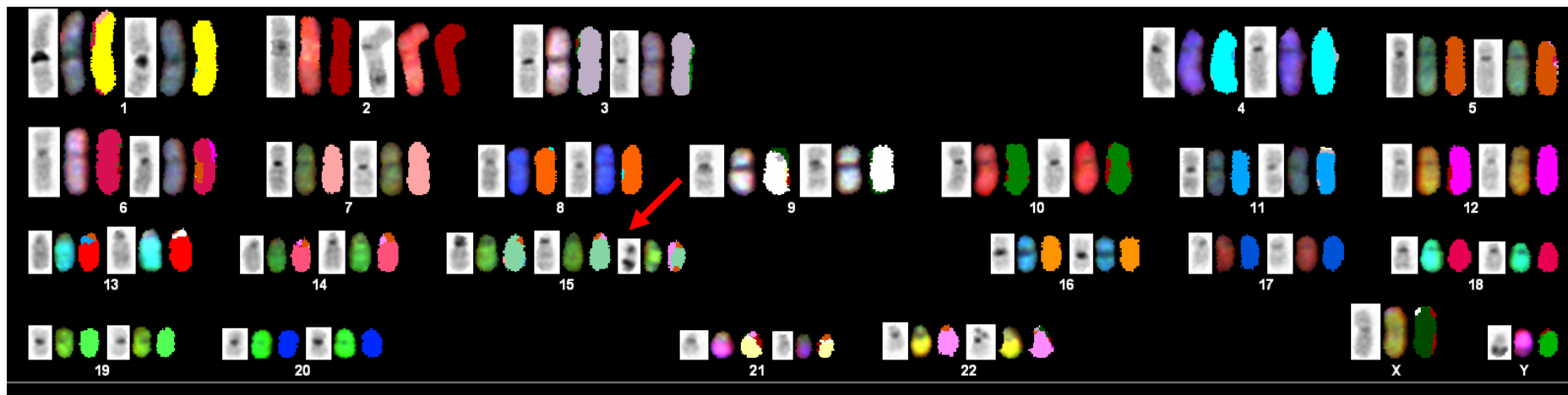


Fig. 7: Cariótipo 47,XY,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

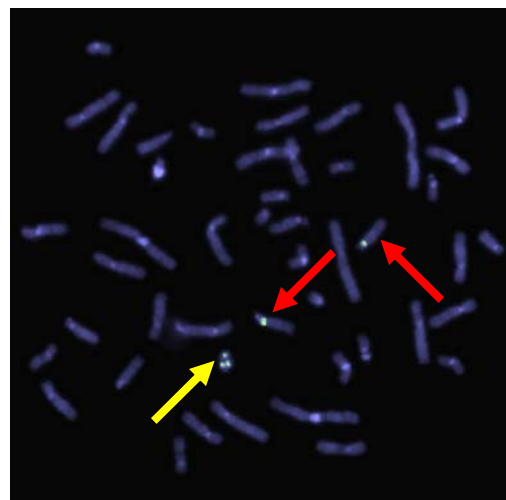


Fig. 8: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de quatro sinais verdes, dois referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e dois sinais presentes no cromossomo marcador (seta amarela), indicando a presença de duas regiões centroméricas, caracterizando o marcador como dicêntrico.

Paciente 2: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+mar em 100 células analisadas (fig. 9) e cariótipo normal para ambos os pais. O estudo citogenético molecular por meio da técnica de SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 9 (fig. 10), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XX,+mar.ish der(9)(SKY). Para confirmação do resultado da técnica de SKY e da presença de região centromérica original do cromossomo 9, foi realizado um experimento de FISH com sonda CEP9 (*spectrum green*) (Cytocell, UK) e foram observados três sinais, referentes ao par cromossômico 9 normal e ao cromossomo marcador (fig. 11), confirmando o resultado da técnica de SKY e a presença de região centromérica originária do cromossomo 9. O cariótipo final foi definido como 47,XX,+der(9)(pterq21).

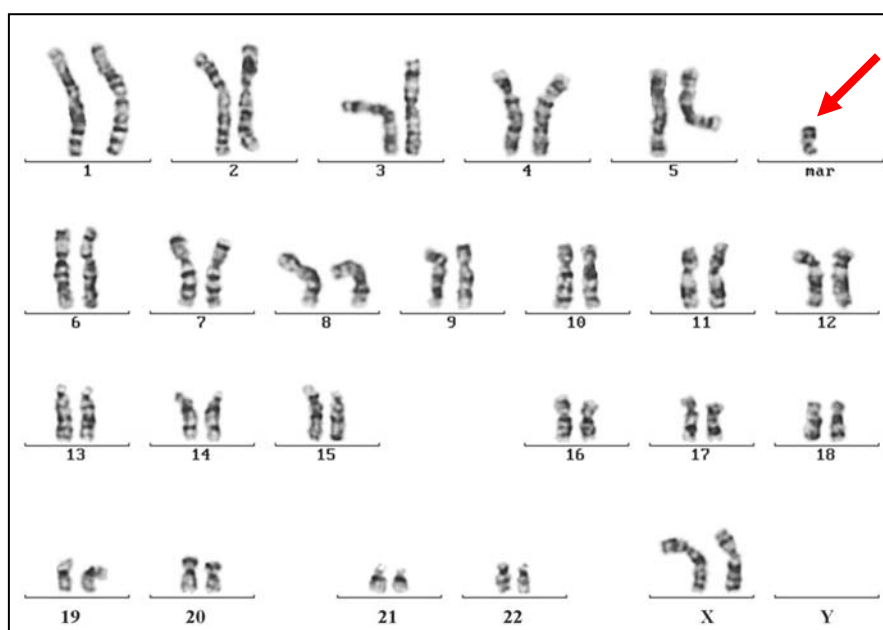


Fig. 9: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 2 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.



Fig. 10: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(9) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 9.

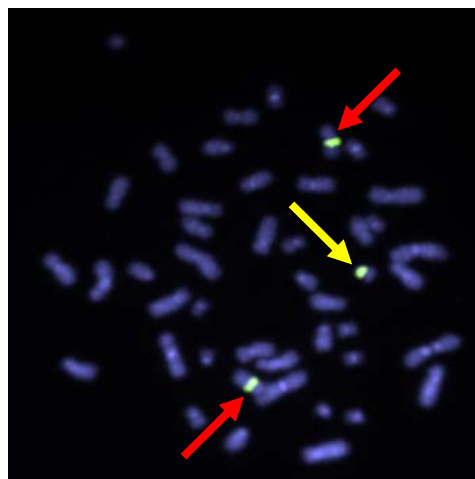


Fig. 11: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP9 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 9 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 9.

Paciente 3: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+mar em todas as 100 células analisadas (fig. 12) e cariótipo normal para ambos os pais. A análise por SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 9 (fig. 13), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XX,+mar.ish der(9)(SKY). Posteriormente, foi aplicada a técnica de FISH com sonda CEP9 (*spectrum green*) (Cytocell, UK), sendo observados três sinais, referentes ao par cromossômico 9 normal e ao cromossomo marcador (fig. 14), confirmando o resultado da técnica de SKY e a presença de região centromérica original do cromossomo 9. O cariótipo final foi definido como 47,XX,+der(9)(pterq32).

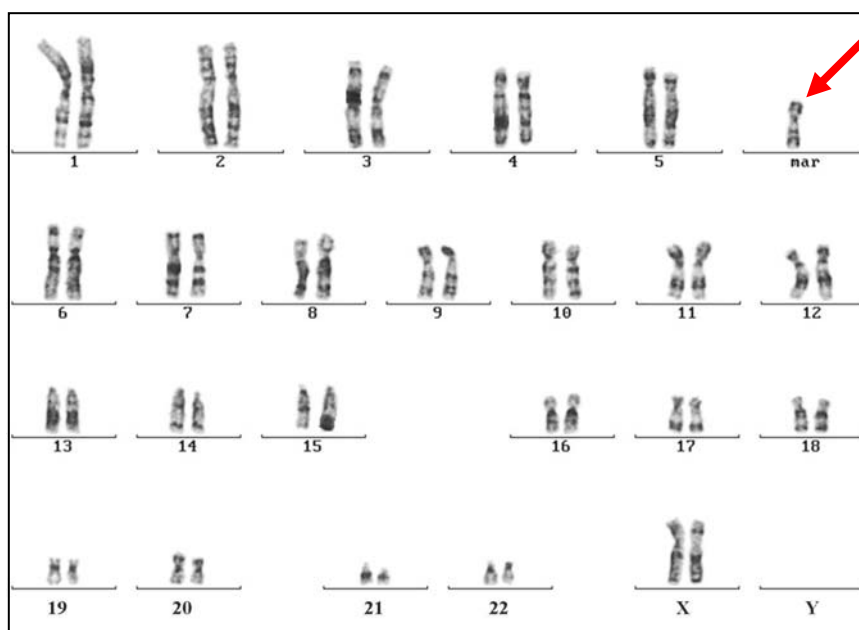


Fig. 12: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 3 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.



Fig. 13: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(9) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 9.

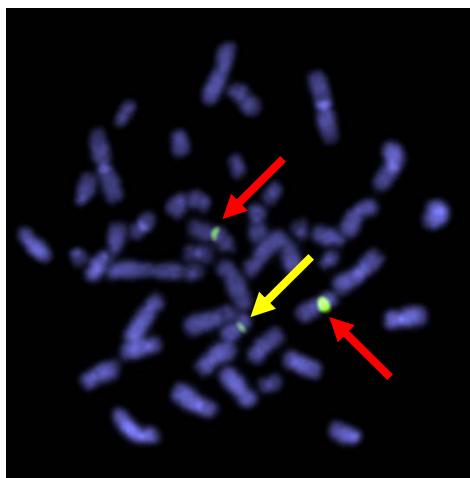


Fig. 14: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP9 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 9 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 9.

Paciente 4: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+mar[9]/48,XX,+2mar[91] (fig. 15) e cariótipo normal para ambos os pais. O estudo citogenético molecular através da técnica de SKY revelou um cromossomo marcador derivativo do cromossomo 4 em todas as metáfases analisadas (fig. 16), mas não foi informativa para a definição da origem do segundo marcador, devido a seu tamanho reduzido. O cariótipo final foi caracterizado como 47,XX,+mar.ish der(4)[9]/48,XX,+mar.ish der(4),+mar[91](SKY). Em seguida, foi aplicada a técnica de FISH com as sondas teloméricas de braço curto (*spectrum green*) e de braço longo (*spectrum orange*) do cromossomo 4 (Cytocell, UK). Foram observados dois sinais vermelhos e dois sinais verdes referentes às regiões teloméricas dos braços curto e longo de ambos os cromossomos 4 normais, mas nenhum sinal nos marcadores (fig. 17). A observação das metáfases em coloração DAPI detectou região centromérica nos 48 cromossomos (fig. 17) evidenciando a presença de centrômero em ambos os cromossomo marcadores. O cariótipo final foi determinado como sendo 47,XX,+der(4)(p16q21)[9]/48,XX,+der(4)(p16q21),+mar[91].

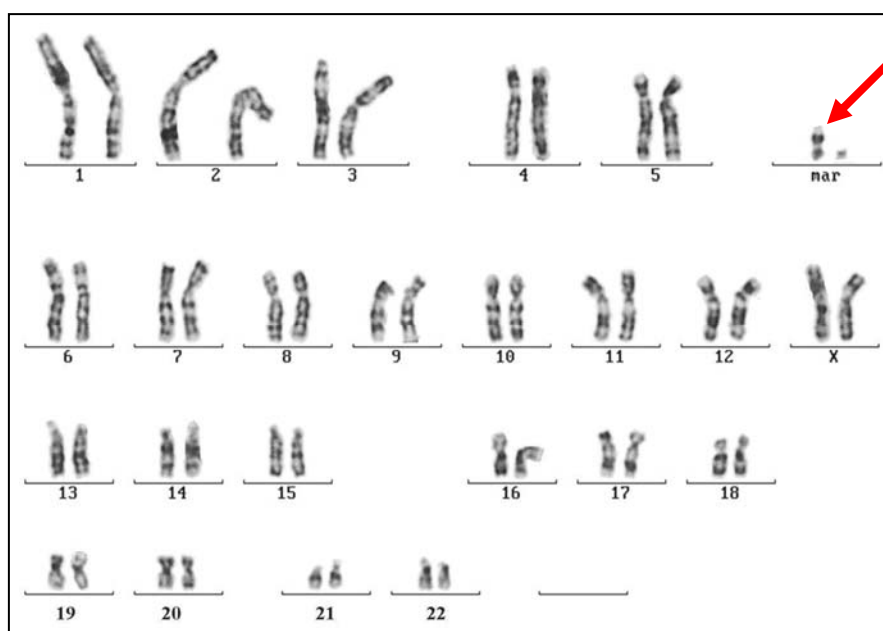


Fig. 15: Cariótipo 48,XX,+2mar em bandeamento GTG, referente à paciente 4 da amostra. Os cromossomos marcadores extranumerários estão indicados pela seta vermelha.

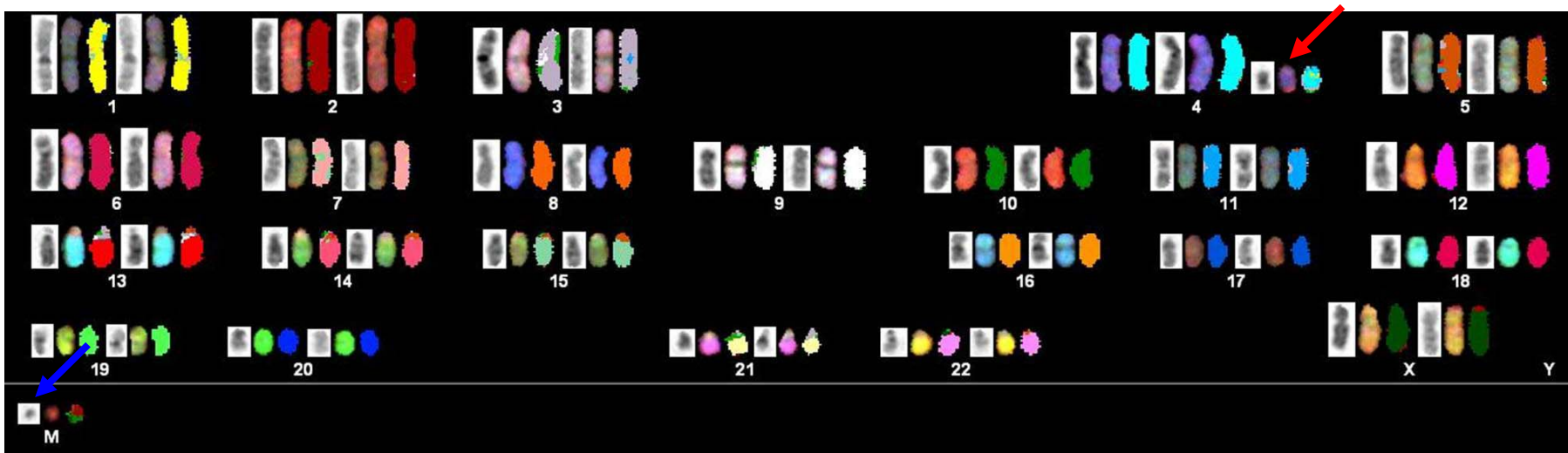


Fig. 16: Cariótipo 48,XX,+mar.ish der(4),+mar em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 4 e a seta azul indica o marcador de origem indeterminada.

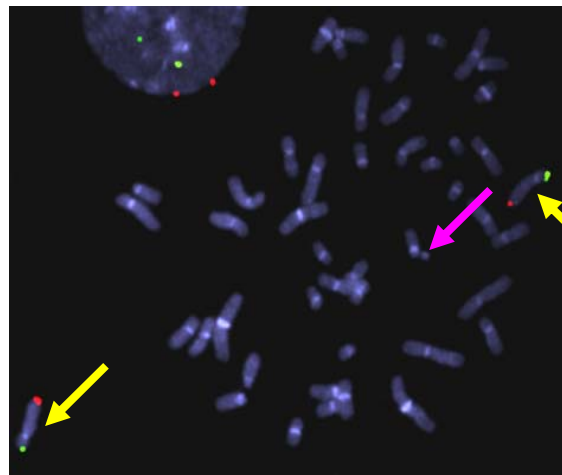


Fig. 17: Célula metafásica e parte de núcleo interfásico após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas teloméricas de braço curto (*spectrum green*) e braço longo (*spectrum orange*) do cromossomo 4, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes referentes aos cromossomos 4 normais (setas amarelas). Também foram observados dois sinais verdes e dois sinais vermelhos no núcleo interfásico, confirmando o resultado observado na metáfase. Não foi observado nenhum sinal referente aos cromossomos marcadores, mas foi observada região centromérica nos 48 cromossomos, sugerindo a presença de centrômero em ambos os marcadores.

Paciente 5: A análise por bandejamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+mar em todas as 100 células analisadas (fig. 18) e cariótipo normal para ambos os pais. A análise por SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15 (fig. 19), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XX,+mar.ish der(15)(SKY). Em seguida, foi realizada a técnica de FISH com sonda CEPI5 (*spectrum green*) (Cytocell, UK) para validação do resultado da técnica de SKY e confirmação da presença de região centromérica original do cromossomo 15. Foram observados quatro sinais verdes, dois referentes ao par cromossômico 15 normal e dois sinais no cromossomo marcador, indicando a presença de duas regiões centroméricas, indicando a presença de um cromossomo isodicêntrico e confirmando os resultados obtidos na técnica de SKY (fig. 20). O cariótipo final foi definido como 47,XX,+idic(15)(pter→q21::q21→p11.2).

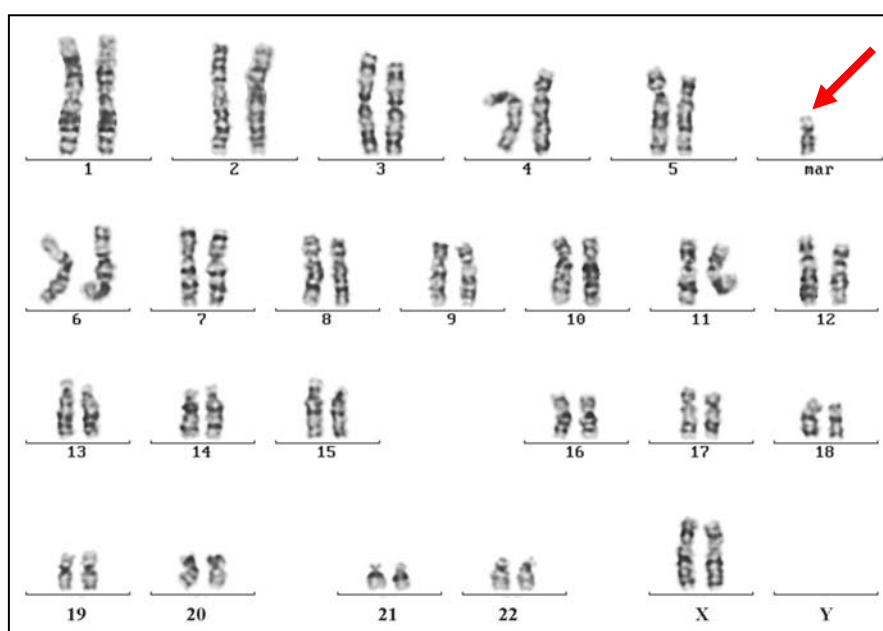


Fig. 18: Cariótipo 47,XX,+mar em bandejamento GTG, referente à paciente 5 da amostra. O cromossomo marcador exanumerário está indicado pela seta vermelha.

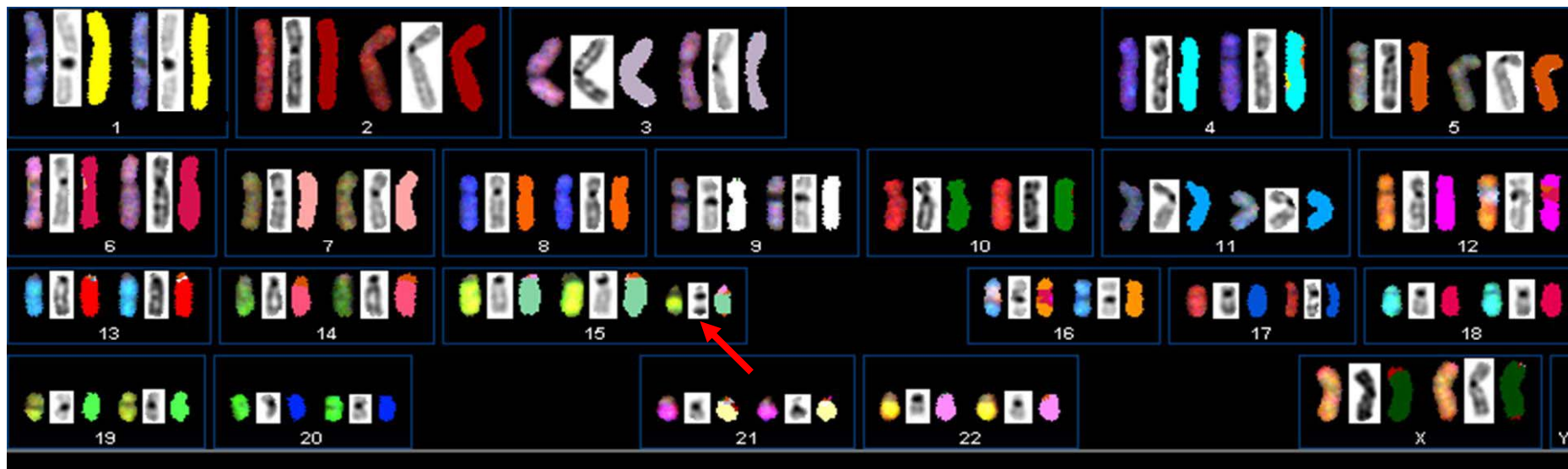


Fig. 19: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

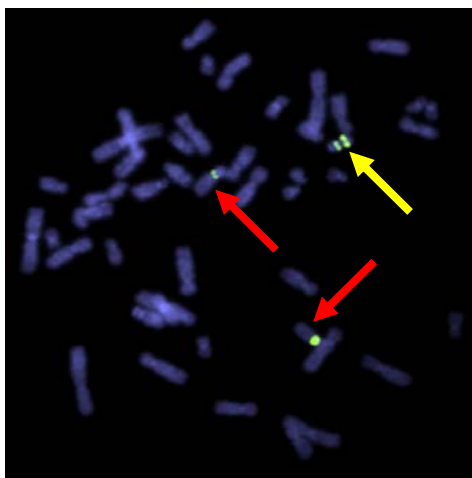


Fig. 20: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de quatro sinais verdes, dois referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e dois sinais presentes no cromossomo marcador (seta amarela), indicando a presença de duas regiões centroméricas e caracterizando o marcador como dicêntrico.

Paciente 6: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XY,+mar em todas as 100 células analisadas (fig. 21). O estudo citogenético da família revelou cariótipo da mãe 46,XX,t(11;22)(q25;q11.2) (fig. 22), do pai e de uma das irmãs cariótipo normal e quatro irmãs e um irmão com translocação 11;22 aparentemente balanceada de origem materna. A aplicação da técnica de SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 22 (fig. 23), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XY,+mar.ish der(22),t(11;22)(SKY). Em seguida, foi realizada a técnica de FISH com utilização de sonda WCP22 (Vysis Inc., USA). Foram observados três sinais, correspondentes aos dois cromossomos 22 normais e ao cromossomo marcador extranumerário, confirmando os resultados obtidos na técnica de SKY (fig. 24). A observação em coloração DAPI determinou a presença de região centromérica no cromossomo marcador (fig. 24). O cariótipo final foi definido como 47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2)mat.

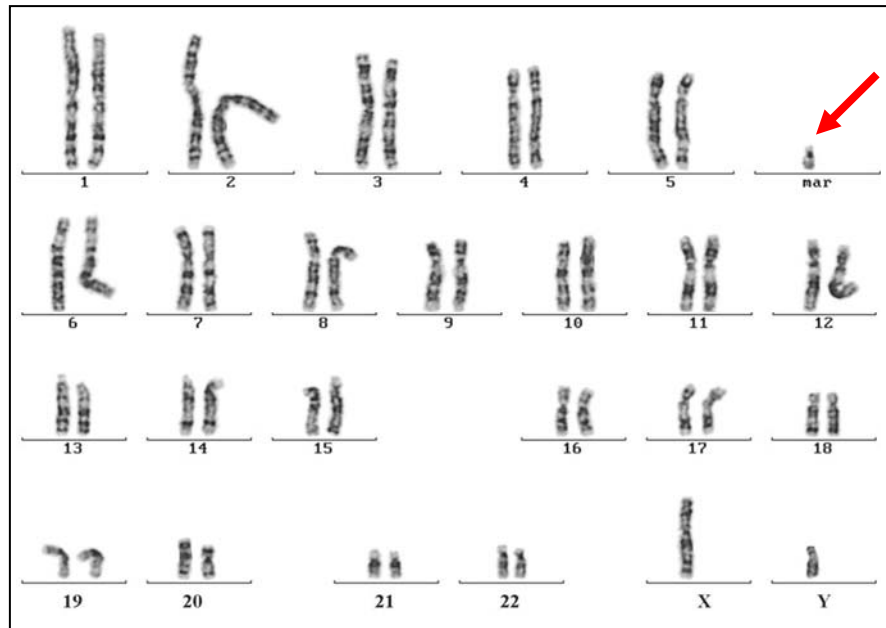


Fig. 21: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 6 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

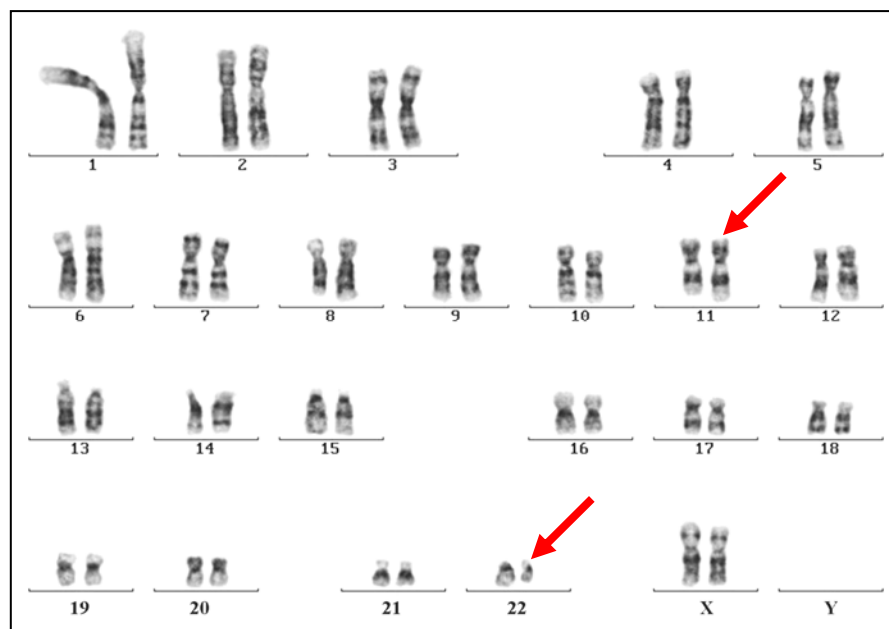


Fig. 22: Cariótipo 46,XX,t(11;22)(q25;q11.2) em bandeamento GTG, referente à mãe do paciente 6 da amostra. Os cromossomos envolvidos na translocação estão indicados pelas setas vermelhas.



Fig. 23: Cariótipo espectral 47,XY,+mar.ish der(22)t(11;22). A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado de uma translocação entre os cromossomos 11 e 22, de herança materna.

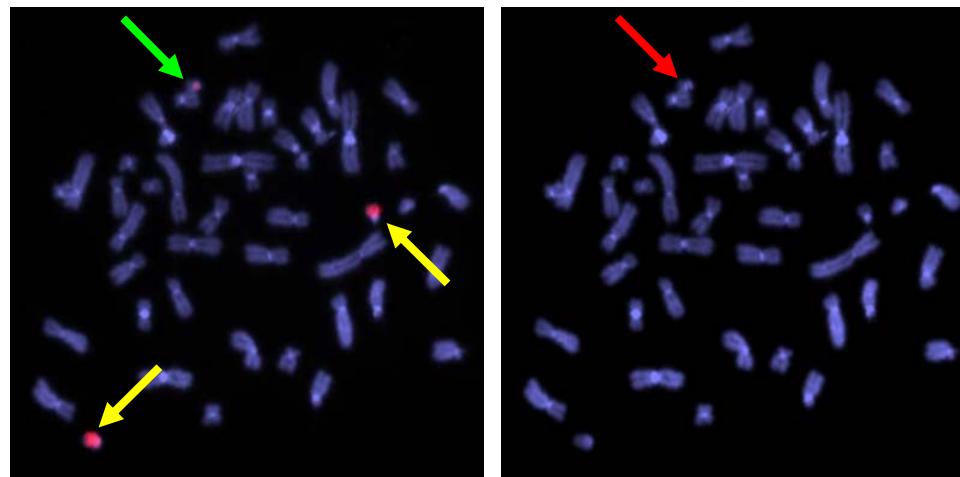


Fig. 24: À direita, célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCP22 (*spectrum orange*), evidenciando a presença de três sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais (seta amarela) e ao cromossomo marcador (seta verde); à esquerda, célula metafásica em coloração DAPI, evidenciando a presença de região centromérica no cromossomo marcador (seta vermelha).

Paciente 7: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+mar em todas as 100 células analisadas (fig. 25) e cariótipo normal para ambos os pais. O estudo por citogenética molecular pela técnica de SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15 (fig. 26), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XX,+mar.ish der(15)(SKY). Em seguida, foi realizada a técnica de FISH com sonda CEPI5 (*spectrum green*) (Cytocell, UK) e foram observados três sinais verdes, correspondentes ao par cromossômico 15 normal e ao cromossomo marcador, confirmando os resultados obtidos na técnica de SKY e a presença de região centromérica original do cromossomo 15 (fig. 27). O cariótipo final foi definido como 47,XX,+der(15)(pterq21).

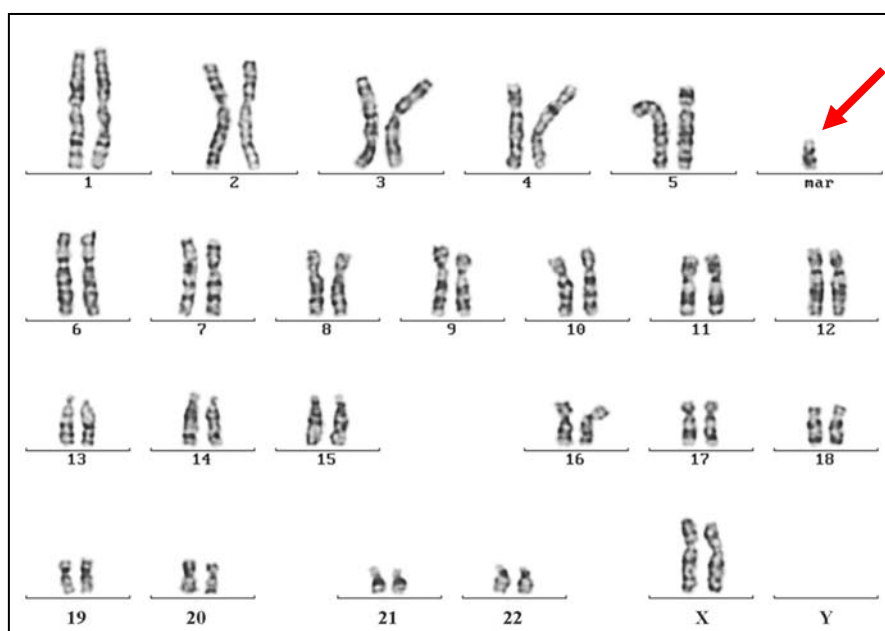


Fig. 25: Cariótipo 47,XX,+mar em bandeamento GTG, referente à paciente 7 da amostra. O cromossomo marcador exanumerário está indicado pela seta vermelha.

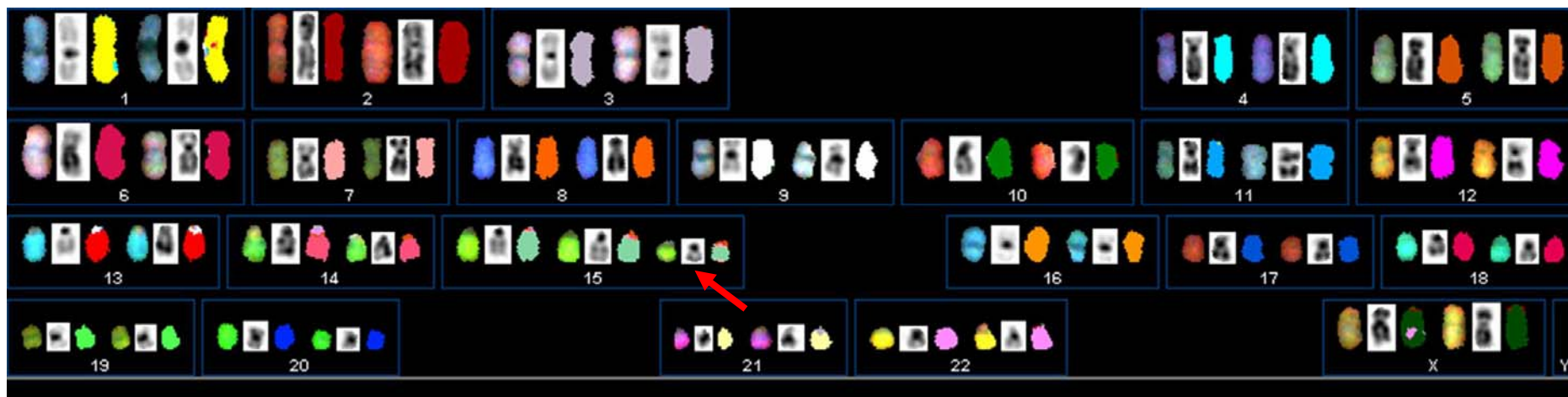


Fig. 26: Cariótipo 47,XX,+mar.ish der(15) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário identificado como originado do cromossomo 15.

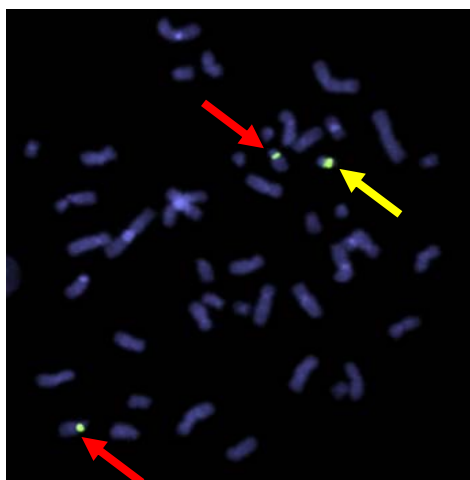


Fig. 27: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de região centromérica do cromossomo 15.

Paciente 8: A análise por bandejamento GTG revelou cariótipo 47,XY,+mar em todas as 100 células analisadas (fig. 28). O estudo citogenético da mãe revelou cariótipo 46,XX,t(15;16)(q13;q13) (fig. 29) e cariótipo normal do pai. O estudo citogenético molecular pela técnica de SKY revelou cromossomo marcador derivativo do cromossomo 15, apresentando a translocação entre os cromossomos 15 e 16 (fig. 30), sendo o cariótipo caracterizado como 47,XY,+mar.ish der(15),t(15;16)(q13;q13)(SKY) Em seguida, foi realizado um experimento de FISH com sonda CEP15 (*spectrum green*) (Cytocell, UK) e foram observados três sinais verdes, referentes aos dois cromossomos 15 normais e ao cromossomo marcador, confirmando os resultados obtidos na técnica de SKY e que o cromossomo marcador é realmente derivativo do cromossomo 15 (fig. 31). O cariótipo final foi definido como 47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)mat.

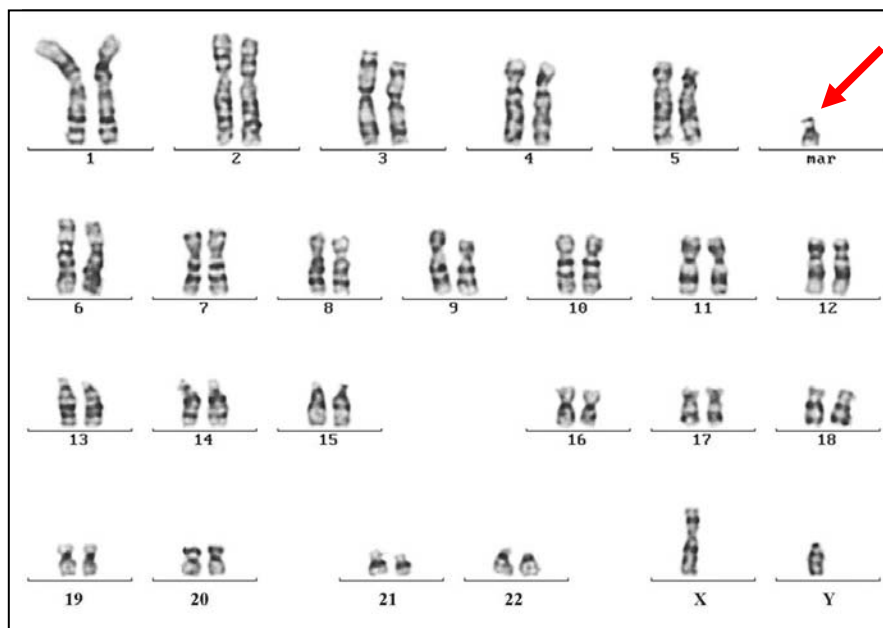


Fig. 28: Cariótipo 47,XY,+mar em bandeamento GTG, referente ao paciente 8 da amostra. O cromossomo marcador extranumerário está indicado pela seta vermelha.

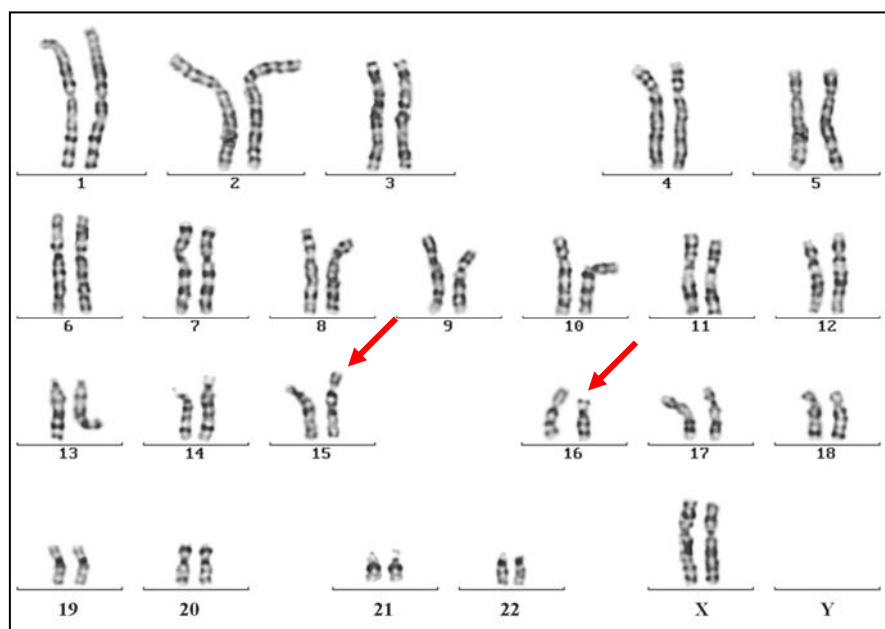


Fig. 29: Cariótipo 46,XX,t(15;16)(q13;q13) em bandeamento GTG, referente à mãe do paciente 8 da amostra. Os cromossomos envolvidos na translocação estão indicados pelas setas vermelhas.

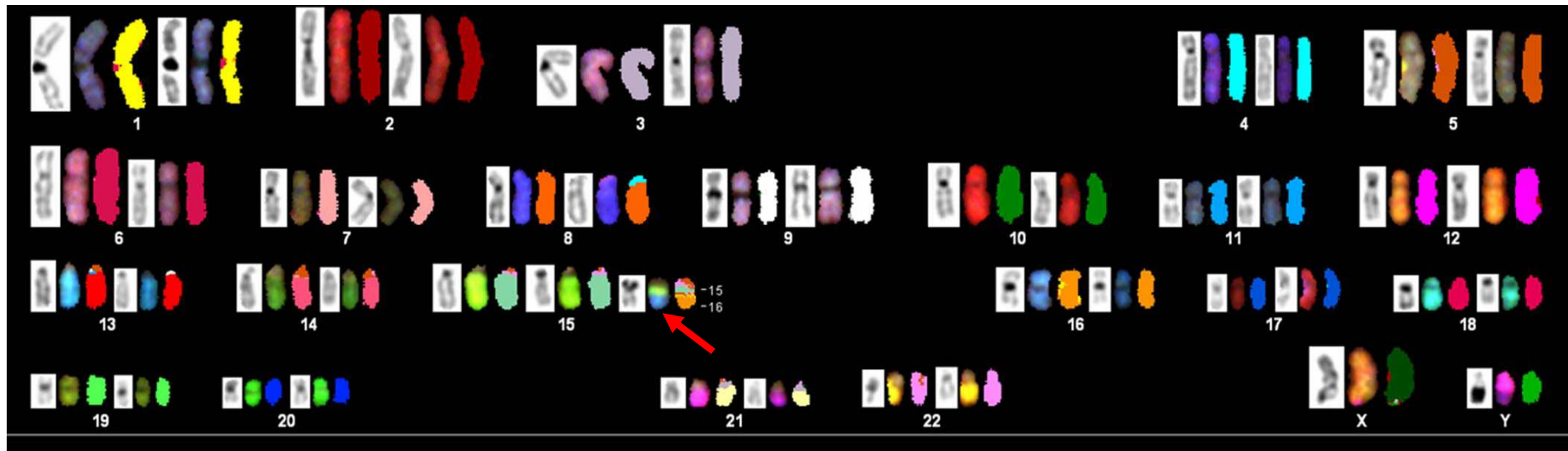


Fig. 30: Cariótipo 47,XY,+mar.ish der(15)t(15;16) em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador exanumerário identificado como originado de uma translocação entre os cromossomos 15 e 16, de herança materna.

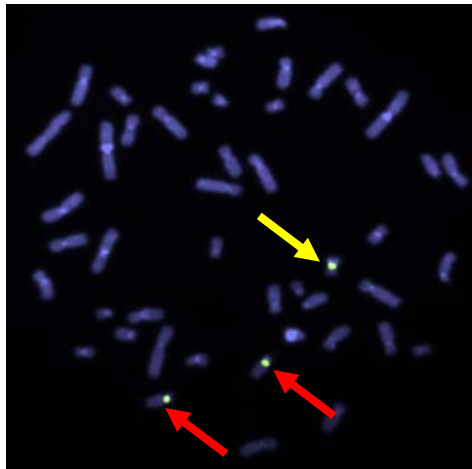


Fig. 31: Célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de três sinais verdes referentes aos dois cromossomos 15 normais (setas vermelhas) e ao cromossomo marcador (seta amarela), confirmando a presença de centrômero do cromossomo 15.

Paciente 9: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 47,XX,+r[24]/46,XX,+ace[3]/46,XX[73] (fig. 32) e cariótipo normal para ambos os pais. O estudo citogenético molecular pela técnica de SKY não foi informativo para a determinação da origem do cromossomo marcador (fig. 33). A análise por bandeamento DAPI revelou a presença de grande quantidade de região heterocromática e sugeriu a presença de duas regiões centroméricas no anel (fig. 34). Foi realizada então a técnica de FISH utilizando as sondas WCPI4 (*spectrum orange*) e WCPI5 (*spectrum green*) (Cytocell, UK). A sonda do cromossomo 15 foi escolhida uma vez que este cromossomo é o mais freqüente nos casos de marcadores descritos na literatura. A sonda do cromossomo 14 foi escolhida por indicação do padrão de bandeamento obtido pela banda DAPI. O resultado revelou dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais, dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais e ausência de sinal no cromossomo marcador em anel (fig. 34).

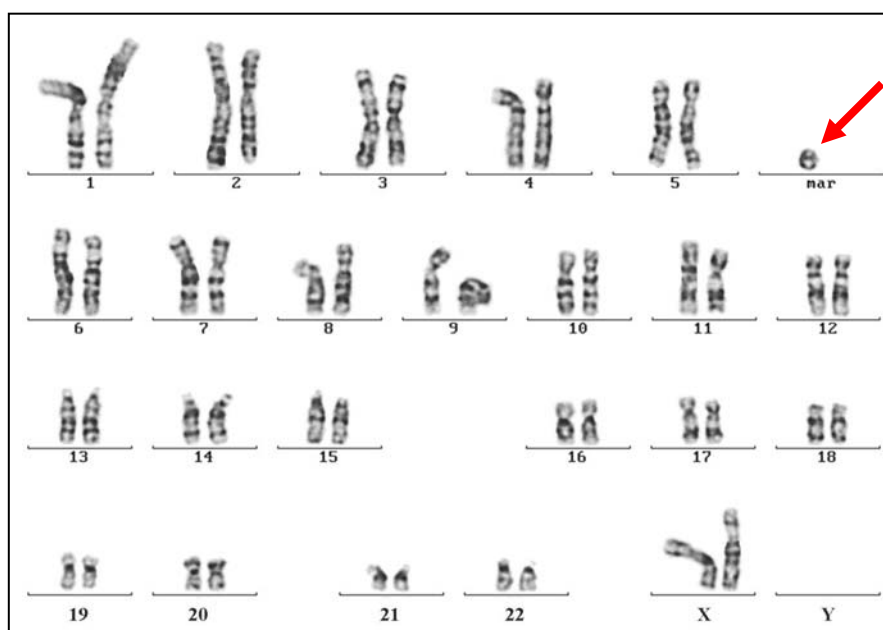


Fig. 32: Cariótipo 47,XX,+r em bandeamento GTG, referente a paciente 9 da amostra. O cromossomo extranumerário em anel está indicado pela seta vermelha.

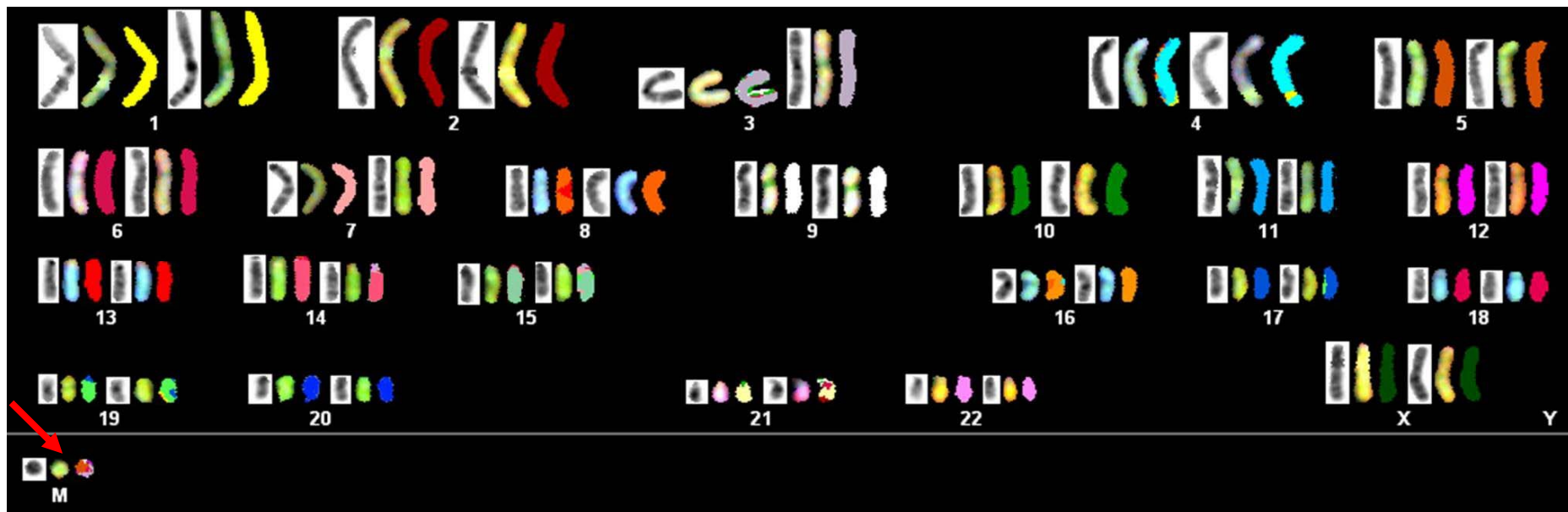


Fig. 33: Cariótipo 47,XY,+mar em SKY. A seta vermelha indica o cromossomo marcador extranumerário não identificado pela técnica aplicada.

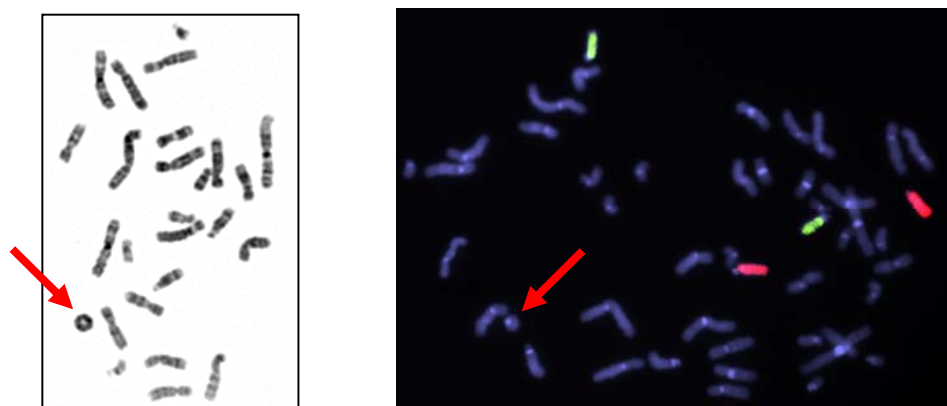


Fig. 34: À direita, metáfase parcial em bandeamento DAPI. A seta vermelha indica o cromossomo marcador em anel, revelando a presença de grande quantidade de heterocromatina. À esquerda, célula metafásica após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas WCP14 (*spectrum orange*) e WCP15 (*spectrum green*), evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais. Não foi observado sinal no cromossomo marcador em anel (seta vermelha), excluindo a origem dos cromossomos 14 e 15.

Pacientes 10 e 11: A análise por bandeamento GTG revelou cariótipo 48,XX,+2mar em todas as 100 células analisadas (fig. 35). O estudo citogenético do pai (paciente 11) revelou cariótipo 48,XY,+2mar em 100 células analisadas (fig. 36). A técnica de SKY neste caso não foi conclusiva para ambos os pacientes, mas indicou a possibilidade de origem do cromossomo marcador como sendo dos cromossomos 5, 14, 22 e Y (fig. 37 e 38). Foi realizado um experimento de FISH com sonda WCP22 (*spectrum orange*) (Vysis Inc., USA) e WCPY (*spectrum green*) (Vysis Inc., USA) em ambos os pacientes. Na paciente 10 foi detectada a presença de dois sinais vermelhos, correspondentes aos dois cromossomos 22 normais e nenhum sinal verde, não sendo observada nenhuma marcação nos cromossomos marcadores (fig. 39). No paciente 11 foram detectados dois sinais vermelhos, correspondentes aos dois cromossomos 22 normais e um sinal verde, correspondente ao cromossomo Y normal, não sendo observada nenhuma marcação nos cromossomos marcadores (fig. 39). Um segundo experimento de FISH foi realizado com sonda WCP5 (*spectrum orange*) (Cytocell, UK) e em ambos os pacientes foram observados dois sinais vermelhos correspondentes ao par cromossômico 5 normal, não sendo observada nenhuma marcação nos cromossomos marcadores (fig. 40). Em seguida, um experimento de FISH foi realizado utilizando-se as sondas WCPI4 (*spectrum orange*) e WCPI5 (*spectrum green*) (Cytocell, UK), testando dessa forma as quatro possibilidades de origem indicadas pelo SKY e também a origem do cromossomo 15, que é o mais freqüente na literatura. Em ambos, foram observados dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais e quatro sinais verdes, dois referentes aos cromossomos 15 normais e dois referentes aos cromossomos marcadores, revelando serem ambos derivativos do cromossomo 15 (fig. 41) Foi realizado finalmente um experimento de FISH com sonda CEP15 (*spectrum green*) (Cytocell, UK), onde foram observados quatro sinais verdes referentes aos dois

cromossomos 15 normais e aos dois cromossomos marcadores, confirmando a presença de região centromérica original do cromossomo 15 (fig. 42).

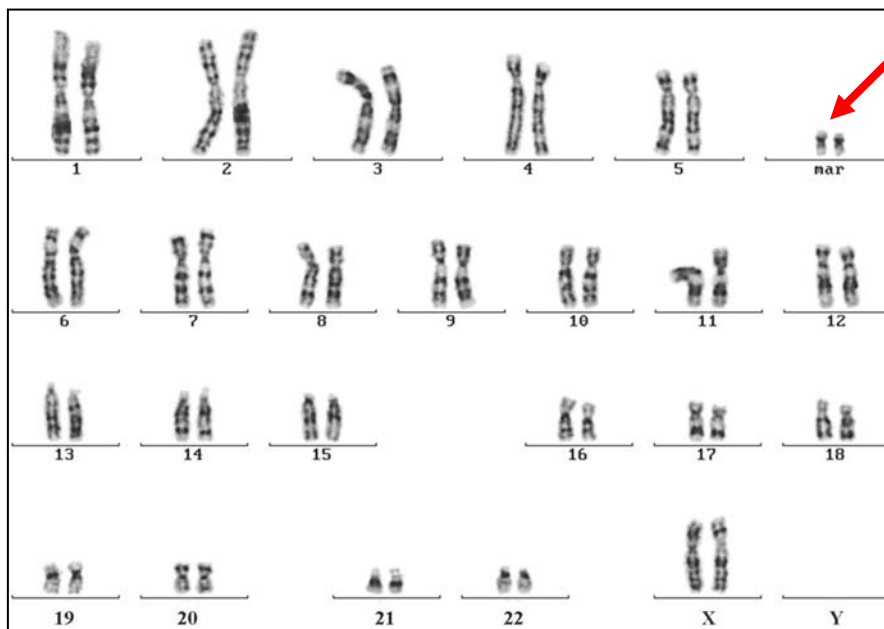


Fig. 35: Cariótipo 48,XX,+2mar em bandeamento GTG, referente à paciente 10 da amostra. Os cromossomos marcadores exanumerários estão indicados pela seta vermelha.

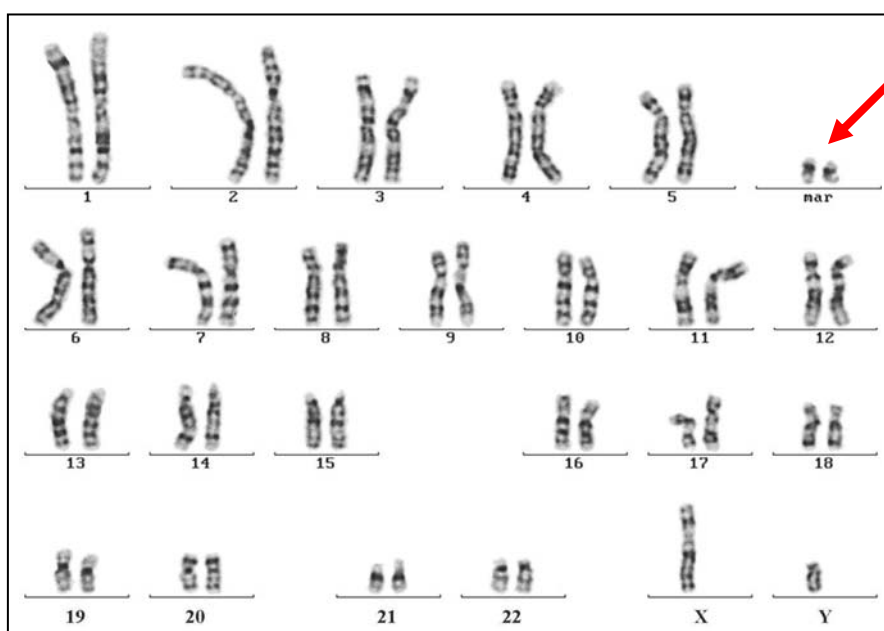


Fig. 36: Cariótipo 48,XY,+2mar em bandeamento GTG, referente ao paciente II da amostra, pai da paciente 10. Os cromossomos marcadores exanumerários estão indicados pela seta vermelha.

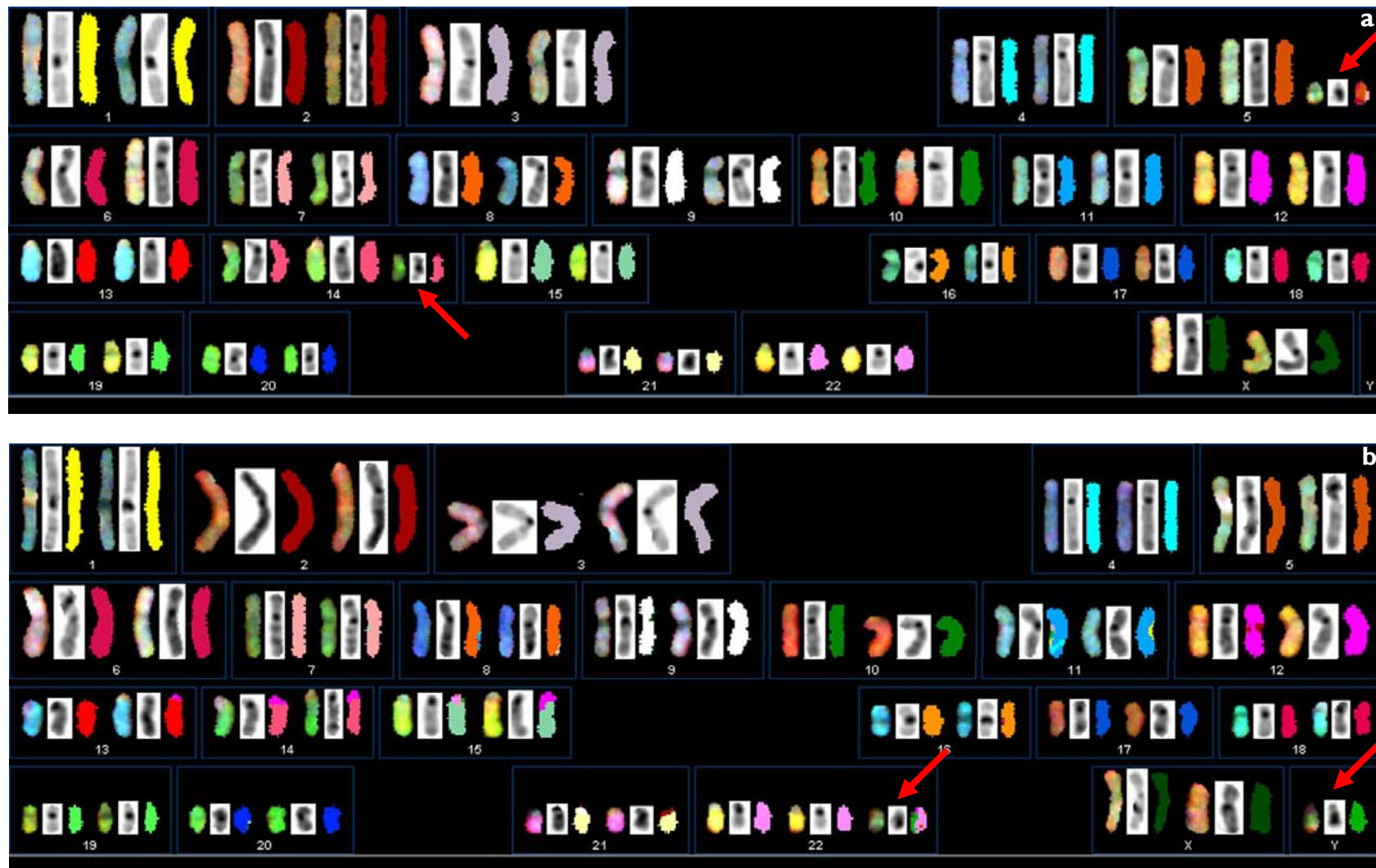


Fig. 37: Cariótipos espectrais 48,XX,+2mar da paciente 10. A técnica não foi conclusiva, mas sugeriu origem dos cromossomos marcadores extranumerários como sendo dos cromossomos 5, 14 (a), 22 e Y (b), indicados pelas setas vermelhas.

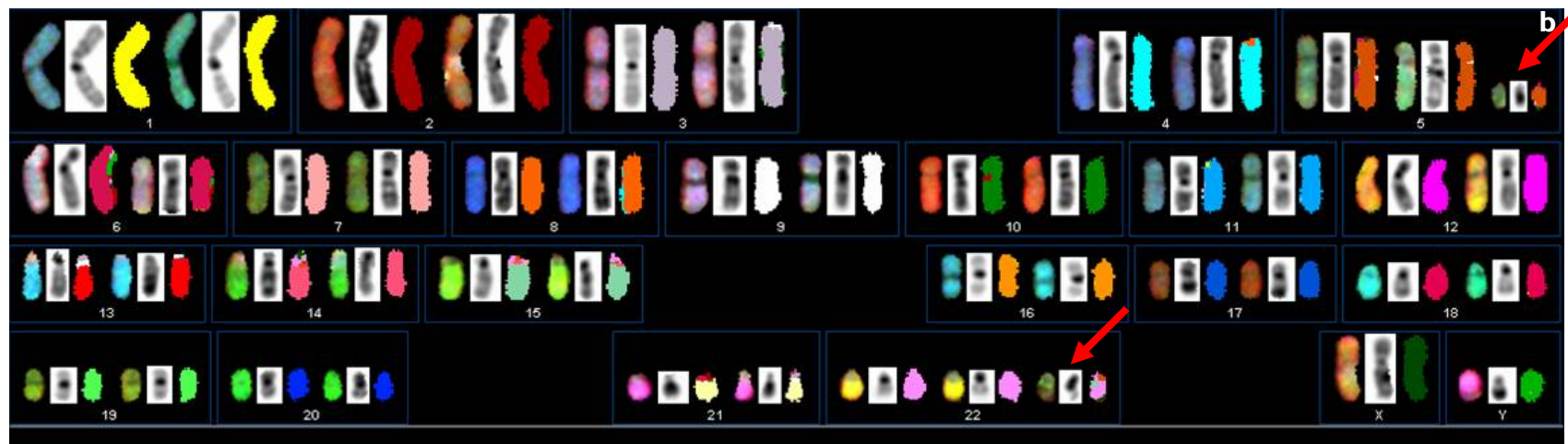
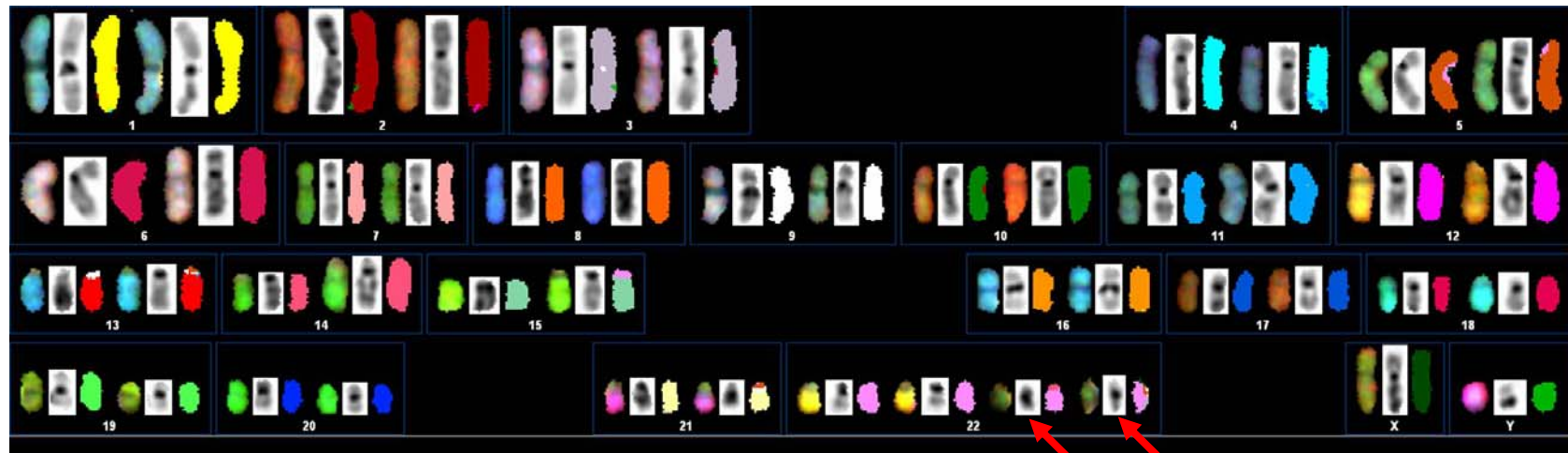


Fig. 38: Cariótipos espectrais 48,XY,+2mar do paciente 11, pai da paciente 10. As imagens sugerem origem dos cromossomos marcadores extranumerários como sendo: (a) ambos dos cromossomos 22; (b) dos cromossomos 5 e 22, indicados pelas setas vermelhas.

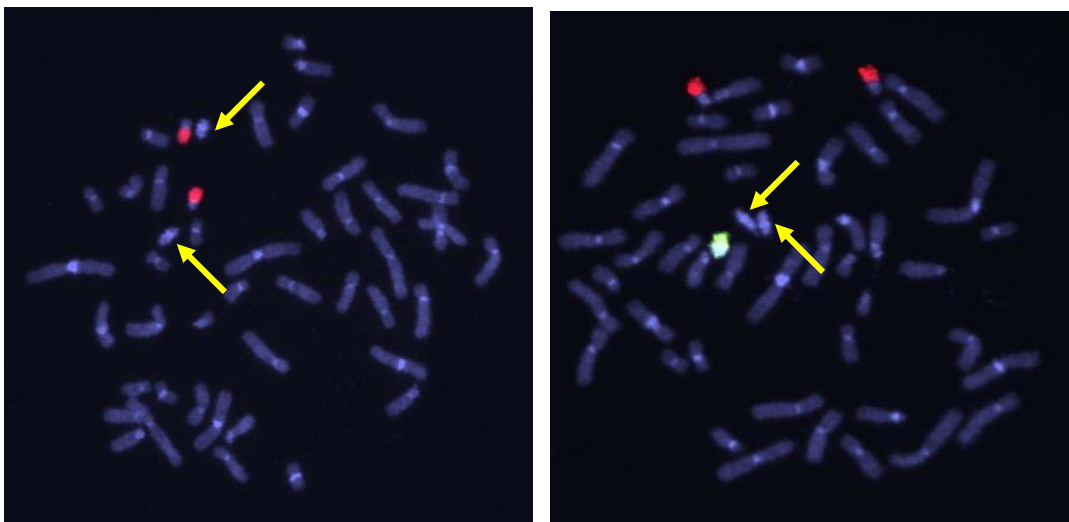


Fig. 39: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas WCP22 (*spectrum orange*) e WCPY (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais e ausência de sinal verde, indicando a ausência de cromossomo Y. À esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 22 normais e um sinal verde referente ao cromossomo Y normal. As setas amarelas indicam os dois cromossomos marcadores extranumerários, com ausência de sinal para essas sondas, excluindo a origem dos cromossomos 22 e Y e evidenciando a presença de região centromérica.

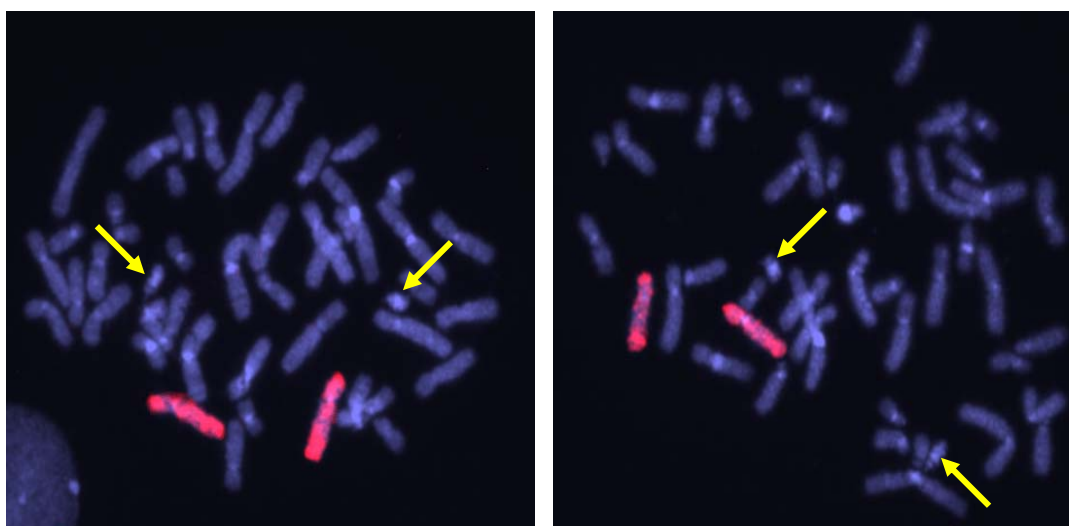


Fig. 40: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCP5 (*spectrum orange*). À direita, metáfase da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 5 normais. À esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10, evidenciando a presença de dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 5 normais. As setas amarelas indicam os dois cromossomos marcadores extranumerários, com ausência de sinal para essa sonda, excluindo a origem do cromossomo 5.

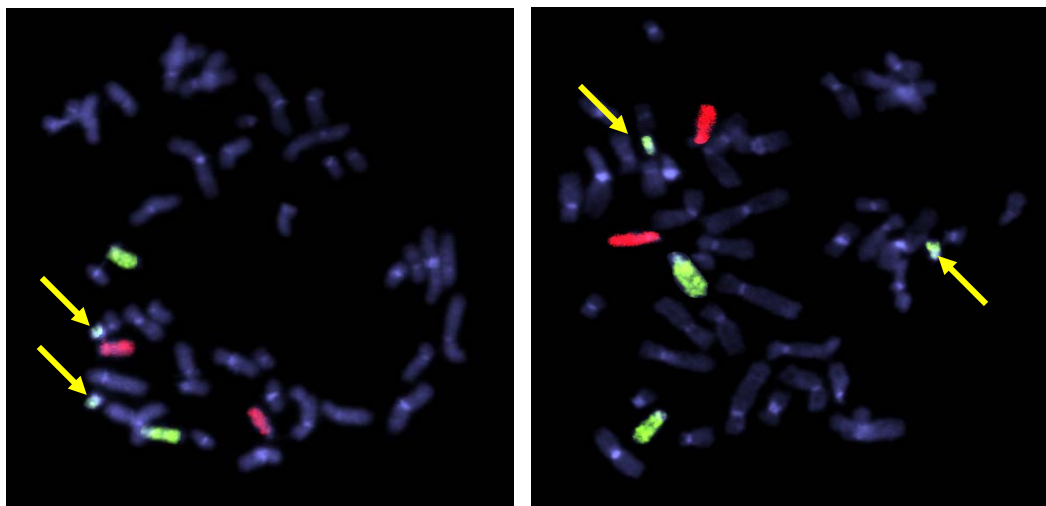


Fig. 41: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda WCPI4 (*spectrum orange*) e WCPI5 (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10 e à esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10. Em ambos observam-se dois sinais vermelhos referentes aos cromossomos 14 normais, dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos marcadores (setas amarelas), revelando origem de cromossomo 15.

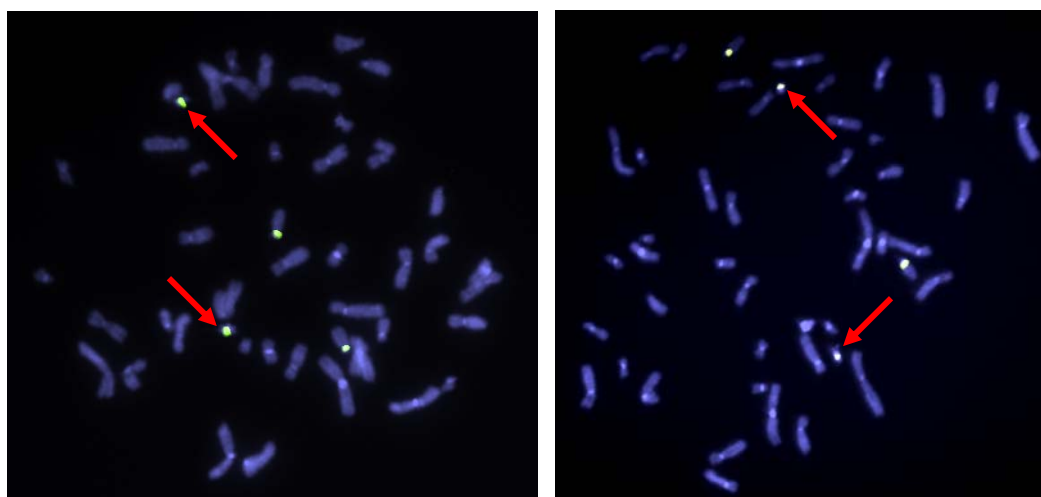


Fig. 42: Células metafásicas após a aplicação da técnica de FISH utilizando a sonda CEP15 (*spectrum green*). À direita, metáfase da paciente 10 e à esquerda, metáfase do paciente 11, pai da paciente 10. Em ambos observam-se dois sinais verdes referentes aos cromossomos 15 normais e dois sinais verdes referentes aos cromossomos marcadores (setas vermelhas), confirmando a presença de centrômero original do cromossomo 15.

Os resultados finais dos cariótipos dos pacientes selecionados após a investigação citogenética convencional e molecular estão sumarizados na tabela II.

Tabela II: Resultados dos cariótipos finais após a aplicação das técnicas de bandeamento GTG, SKY e FISH.

Paciente	Cariótipo Final
1	47,XY,+idic(15)(pter→q15::q15→pter)[72]/46,XY[28]
2	47,XX,+der(9)(pterq21)
3	47,XX,+der(9)(pterq32)
4	47,XX,+der(4)(p16q21)[9]/48,XX,+der(4)(p16q21),+mar[91]
5	47,XX,+idic(15)(pter→q21::q21→p11.2)
6	47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2)mat
7	47,XX,+der(15)(pterq21)
8	47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)mat
9	Não conclusivo
10	48,XX,+2der(15)(pterq12)
11	48,XY,+2der(15)(pterq12)

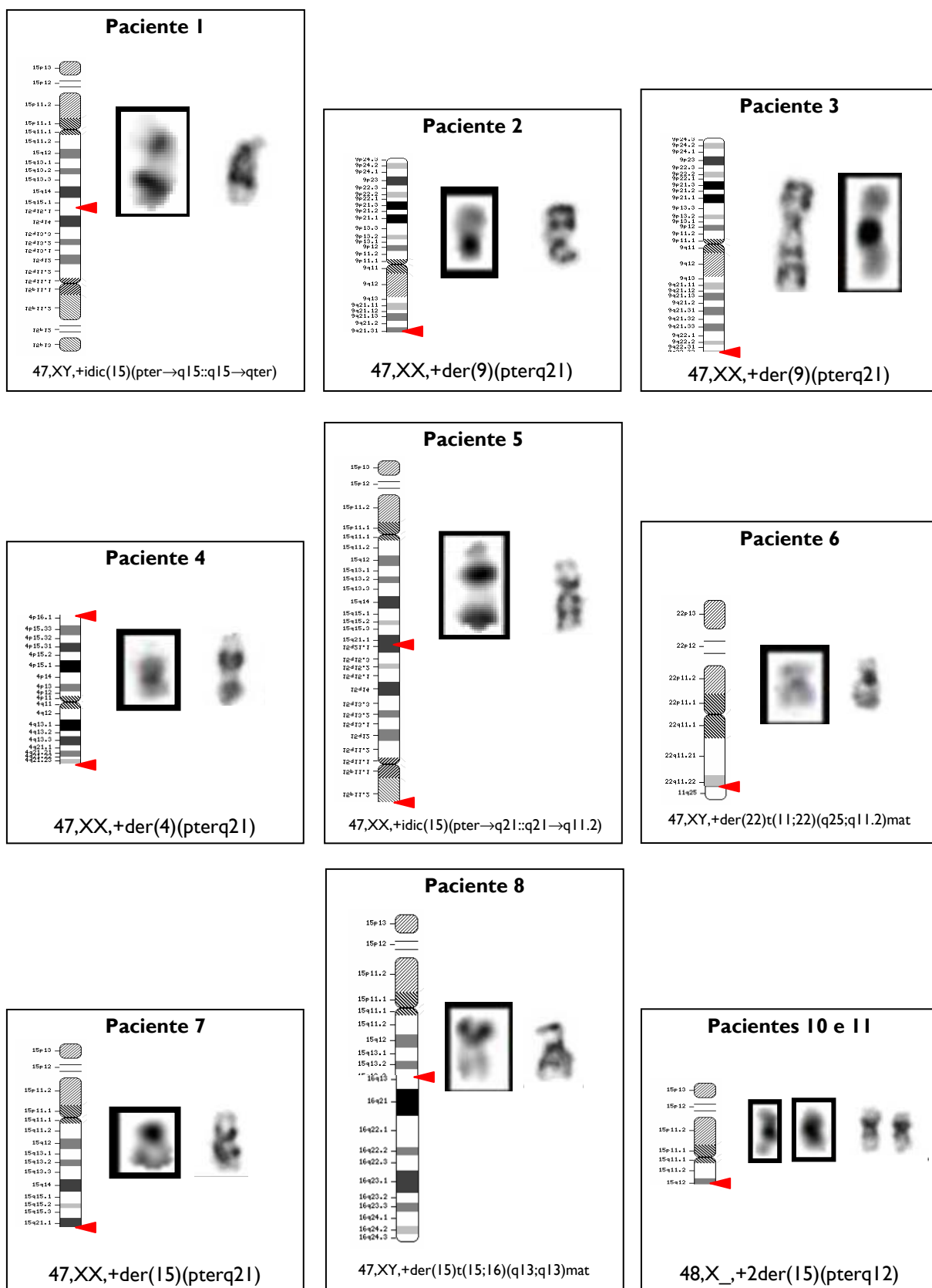


Fig. 43: Esquema ilustrativo dos resultados finais. O ideograma à esquerda representa as bandas presentes nos cromossomos marcadores e as setas vermelhas indicam os pontos de quebra. Ao centro, os cromossomos marcadores em bandeamento DAPI e à direita, os marcadores em bandeamento GTG.

Discussão

A aplicação de técnicas de citogenética molecular tem sido utilizada amplamente para caracterização dos cromossomos marcadores. No presente estudo, em dez dos onze casos analisados foi possível determinar a origem do cromossomo marcador por meio da técnica de SKY e em nove pacientes, esses resultados foram confirmados pela técnica de FISH.

Métodos de citogenética clássica são indicados há muitos anos para avaliação de aberrações cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais. As informações geradas pela investigação citogenética permitiram a correlação entre determinadas alterações e diversas doenças, como câncer e síndromes malformativas, assim como serviram de base para o entendimento de várias doenças humanas. Em paralelo, a sofisticação das tecnologias de clonagem e a sensibilidade dos anticorpos conjugados permitiu o avanço nos ensaios baseados em fluorescência em laboratórios de citogenética molecular, propiciando a detecção de alterações as quais a resolução das técnicas de citogenética clássica não permitia detectar (BAYANI e SQUIRE, 2001).

O desenvolvimento da técnica de FISH ocorreu pela combinação entre técnicas de citogenética clássica e tecnologias de DNA recombinante. Inicialmente, por meio da incorporação de haptenos, como biotina e digoxigenina, nas moléculas de ácido nucléico modificadas, que eram marcados por moléculas fluorescentes, como avidina e anti-digoxigenina, permitindo sua detecção. Em seguida, a preparação de sondas de DNA foi modificada e simplificada, e atualmente, a marcação é feita pela incorporação direta de fluoróforos, um método muito mais rápido e menos trabalhoso. As vantagens da FISH sobre as técnicas de citogenética convencional estão relacionadas à sua acurácia e sua maior resolução, permitindo a detecção de alterações não detectadas por outras metodologias. Essa técnica também tem sido usada para validação de resultados obtidos em outras técnicas de citogenética molecular, por se tratar de um método mais preciso de detecção. Em relação às técnicas de biologia molecular, a FISH fornece informações relacionadas à

morfologia celular e permite, além da detecção da presença de determinadas seqüências, o mapeamento de regiões e até de bandas cromossômicas (BEATTY et al., 2002).

A grande desvantagem da técnica de FISH está relacionada à necessidade de um conhecimento prévio da região a ser analisada, assim como a disponibilidade de sondas que irão detectar determinadas aberrações. Dessa forma, a presença de cromossomos marcadores é um dos grandes desafios para a aplicação da FISH, uma vez que a citogenética clássica muitas vezes não fornece nenhuma indicação a respeito de qual sonda deve ser utilizada para determinação da origem desses cromossomos extranumerários.

Recentemente, a utilização da técnica de SKY tem sobreposto algumas das limitações da FISH. Uma vez que não é necessário um conhecimento prévio das possíveis regiões envolvidas, o Cariótipo Espectral tem sido efetivo na determinação da origem de cromossomos marcadores (HADDAD et al., 1998), assim como na detecção de rearranjos intercromossomais não evidenciados por outras metodologias (VELDMAN et al., 1997; UHRIG et al., 1999). Contudo, a técnica também possui limitações. A resolução da técnica foi estimada como sendo em torno de 1,5Mb (SCHRÖCK et al., 1996), ou seja, aberrações que envolvem pequenas regiões não são detectadas. Além disso, alterações intracromossomais, como duplicações, deleções e inversões podem não ser reveladas e esse método não é capaz de determinar qual a região cromossômica envolvida na aberração (FAN et al., 2000; LEE et al., 2001).

Nos casos de rearranjos estruturais com justaposição de cromossomos não homólogos, a sobreposição de fluorescência na interface do segmento translocado, fenômeno conhecido como *flaring*, pode distorcer o padrão de fluorescência naquela região, levando a erros de classificação e considerando a presença de material cromossômico extra na interface. Além disso, a análise de cromossomos relativamente curtos ou rearranjos

envolvendo pequenos segmentos, mesmo aqueles ricos em eucromatina, podem também sofrer esse fenômeno, dificultando a interpretação dos resultados (LEE et al., 2001).

Outros fatores também podem causar erros nos resultados do SKY: (1) preparações cromossômicas pobres em metáfases e pré-tratamentos inadequados que resultam em acúmulo de citoplasma e dificultam a hibridação da sonda; (2) longo tempo de denaturação, que leva à diminuição da intensidade da fluorescência e aumento do *flaring* e (3) secagem da sonda durante a hibridação, que reduz a eficiência da hibridação e aumenta o *background*. (LEE et al., 2001). Além disso, o elevado custo do coquetel de sonda e do sistema de captura e análise e a necessidade de validação dos resultados pela técnica de FISH dificultam sua aplicação rotineira nos laboratórios de diagnóstico.

No presente estudo, a técnica de SKY foi informativa para determinação da origem dos cromossomos marcadores em oito casos (pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Em três casos (pacientes 9, 10 e 11) essa técnica não foi informativa. Nos pacientes 10 e 11, os cromossomos marcadores eram muito pequenos e a resolução do método não foi suficiente para sua caracterização. Já na paciente 9, a presença de grande quantidade de heterocromatina no cromossomo marcador em anel pode ter influenciado na marcação das sondas.

Cromossomos marcadores pequenos ocorrem numa frequência de 0,01% a 0,05% dos casos submetidos ao diagnóstico pré-natal (CROLLA, 1998b) e é praticamente impossível a determinação de sua origem aplicando-se técnicas de citogenética convencional. Esses marcadores são ricos em heterocromatina, incluindo nenhuma ou pouquíssima região eucromática, tornando a técnica de SKY também inapropriada para sua caracterização. Novas técnicas de FISH multicolor têm sido utilizadas para determinação da origem desses marcadores pequenos. A técnica de FISH-multicolor centrômero-específico ou cenM-FISH (NIETZEL et al., 2001) permite a identificação sem ambigüidade das regiões centroméricas

de todos os 24 cromossomos humanos em um único experimento, excluindo os cromossomos 13 e 21, enquanto que a técnica de FISH-multicolor subcentromérica-específica ou subcenM-FISH permite a detecção de eucromatina na região subcentromérica (STARKE et al., 2003a). Cromossomos marcadores derivados de todos os cromossomos humanos, com exceção do cromossomo 6, já foram identificados por cenM-FISH e subcenM-FISH, mostrando a eficiência desses métodos (NIETZEL et al., 2001; STARKE et al., 2003a; STARKE et al., 2003b; LIEHR et al., 2004b; LIEHR et al., 2005; MRASEK et al., 2005; TONNIES et al., 2006; PIETRZAK et al., 2007).

Contudo, uma limitação é imposta para a aplicação dessas técnicas. Uma vez que a marcação ocorre nas regiões centroméricas e subcentroméricas, é fundamental que essas regiões estejam intactas, ou seja, não é possível identificar cromossomos mitoticamente estáveis que apresentem neo-centrômeros ou mitoticamente instáveis sem material pericentromérico (NIETZEL et al., 2001).

A permanência dos cromossomos marcadores no cariótipo humano depende da sua estabilidade no processo mitótico. Assim, a presença de região centromérica é fundamental para esse processo, através da ligação das fibras do fuso durante a divisão celular. O centrômero é composto por diversas famílias de DNA repetitivo, dentre as quais a α -satélite é a mais abundante (GUTIÉRREZ-ANGULO et al., 2001). Essas seqüências possuem três domínios: (1) o domínio interno de pareamento, responsável pela ligação entre as cromátides-irmãs; (2) o domínio central e (3) o domínio do cinetócoro, responsáveis pelo ancoramento de proteínas centroméricas que se ligam às fibras do fuso. Além das seqüências α -satélite, o DNA satélite I e o DNA β -satélite estão presentes na região pericentromérica e têm papel fundamental na estabilidade e funcionamento dessa região (VOULLAIRE et al., 1993; CHOO et al., 1997).

Recentemente, uma nova classe de cromossomos marcadores foi descrita: os cromossomos marcadores com neo-centrômeros. Os neo-centrômeros, apesar de não possuírem DNA α -satélite, são capazes de ancorar proteínas centroméricas e podem, assim, desempenhar papel semelhante ao centrômero original. Apesar de se apresentarem como uma constrição igual ao de um centrômero normal, eles não hibridam com sondas de DNA α -satélite, e sua origem pode ser determinada por microdissecção e posterior hibridação numa metáfase normal (KNEGT et al., 2002) ou por Hibridação Genômica Comparativa nos casos de aneuploidias (LEVY et al., 2000). A quantidade e extensão de heterocromatina centromérica parecem estar reduzidas nos neo-centrômeros, o que se reflete na redução da coesão das cromátides-irmãs (BERNARD e ALLSHIRE, 2002; AMOR et al., 2004).

Os neo-centrômeros já foram observados em vários cromossomos humanos e é razoável assumir que podem ser encontrados em todos eles. No entanto, parece haver regiões preferenciais para formação desta estrutura, incluindo as regiões 3q, 13q e 15q. No caso dos cromossomos marcadores, a formação dos neo-centrômeros parece estar relacionada principalmente com a ausência de centrômero num fragmento acêntrico, propiciando a ativação do neo-centrômero. No entanto, a observação de cromossomos neodicêntricos sugere que um neo-centrômero pode ser ativado mesmo na presença do centrômero adicional e em cromossomos intactos, que não sofrem rearranjos. Esses mecanismos são pouco esclarecidos e as causas que levam à formação dos neo-centrômeros ainda permanecem desconhecidas (WARBURTON, 2004).

No presente estudo, a aplicação da técnica de FISH utilizando as sondas centroméricas dos cromossomos 9 e 15 foi informativa para a presença de centrômeros originais nos pacientes 1, 2, 3, 5, 7 e 8, descartando a presença de neo-centrômeros. Nos casos 1 e 5, a utilização desse tipo de sonda ainda foi capaz de demonstrar a presença de duas regiões centroméricas originais, sugerindo se tratar de cromossomos marcadores

dicêntricos. A utilização dessas sondas, além de descartar a presença dos neo-centrômeros, foi importante, pois, ao confirmar a presença e localização do centrômero original, também permitiu inferir quais bandas cromossômicas estavam presentes nos marcadores, auxiliando a determinação dos pontos de quebra.

Recentemente, a aplicação das técnicas de CGH metafásico e CGH-array tem aperfeiçoado a caracterização dos cromossomos marcadores, uma vez que fornecem resultados mais precisos em relação às regiões em trissomia parcial e aos genes envolvidos nesses rearranjos. Assim, a correlação com o fenótipo desses pacientes é melhor definida, assim como a possível função de cada gene no desenvolvimento das manifestações clínicas. A presença de eucromatina nos cromossomos marcadores parece ser fundamental para o desenvolvimento de um fenótipo clinicamente relevante, ao passo que cromossomos marcadores ricos em heterocromatina parecem ter um efeito menos significativo. A técnica de CGH é capaz de informar qual região cromossômica está presente nos cromossomos marcadores, e assim, determinar os pontos de quebra.

No entanto, algumas desvantagens foram apresentadas em estudos que utilizam essa técnica. A principal delas é a resolução, uma vez que deleções menores que 10Mb e ampliações menores que 2Mb não podem ser detectadas (MANTRIPRAGADA et al., 2004).

Algumas características podem comprometer a qualidade dos resultados obtidos pela técnica de CGH e alguns pontos críticos devem ser analisados, como: (1) a qualidade das metáfases na lâmina, (2) a qualidade do DNA que será usado como sonda, (3) a marcação desse DNA e (4) a qualidade do equipamento utilizado. Além disso, a supressão de seqüências de DNA repetitivo pela COTI DNA é um ponto fundamental para o sucesso da técnica, uma vez que essas regiões poderiam ser erroneamente classificadas como regiões de amplificação pelo *software* que analisa os resultados obtidos após a hibridação.

A técnica de CGH pode ser então informativa nos casos de cromossomos marcadores grandes, que possuem região eucromática, enquanto que os marcadores pequenos e/ou aqueles que possuem muita heterocromatina podem ter sua caracterização dificultada.

Muitas das desvantagens apresentadas pela técnica de CGH metafásico podem ser sobrepostas na técnica de CGH-array. Ambas possuem o mesmo princípio, mas a principal diferença é que no CGH-array clones genômicos selecionados de regiões do genoma substituem a metáfase como alvo da hibridação (SOLINAS-TOLDO et al., 1997; PINKEL et al., 1998; SNIJDERS et al., 2001; YU et al., 2003). Há assim um considerável aumento em termos de resolução e especificidade da análise, uma vez que o tamanho dos clones e seu posicionamento nos cromossomos é que determinam a sua resolução (MANTRIPRAGADA et al., 2004). Sendo assim, essa técnica pode ser muito informativa para rearranjos e deleções não detectados por outras técnicas citogenéticas e para a caracterização dos cromossomos marcadores, independente de seu tamanho ou composição (ISHKANIAN et al., 2004).

Recentemente, uma plataforma de CGH-array específica para cromossomos marcadores foi desenvolvida, denominada Signature MarkerChip™ (Signature Genomics Laboratories, USA). Esta plataforma contém 911 clones de BACs, com uma resolução de aproximadamente 5,3Mb, que correspondem às regiões pericentroméricas de todos os cromossomos humanos. Sendo assim, é possível determinar a origem de qualquer cromossomo marcador, independente do seu tamanho. No entanto, para casos de marcadores maiores, essa plataforma não é capaz de determinar todas as regiões presentes em trissomia, sendo mais informativa para a presença de eucromatina nos cromossomos marcadores pequenos (www.signaturegenomics.com/markerchip.html).

Atualmente, a aplicação do CGH-array na clínica é cada vez maior, mas não se sabe exatamente qual o papel desta técnica nos laboratórios de diagnóstico. Muitas doenças de desenvolvimento associado a fatores genéticos ainda desconhecidos dependem de uma análise genômica global. Plataformas específicas para esse tipo de análise têm custo elevado, e a análise e o controle de qualidade do experimento são difíceis (RICKMAN et al., 2006). Além disso, estudos recentes revelaram um significativo aumento de polimorfismos de número de cópias na população normal, que podem ser interpretados como ganho de material genético, e assim reforçam a necessidade de plataformas contendo um limitado número de clones que amenizariam os problemas na interpretação dos resultados (CHEUNG et al., 2005; RICKMAN et al., 2006; SAHOO et al., 2006; SHAFFER et al., 2006).

Uma grande variabilidade fenotípica está relacionada com a presença de cromossomos marcadores, tornando esse tipo de aberração cromossômica, uma das mais difíceis para determinação do prognóstico e para o aconselhamento genético, especialmente quando encontrado em exames pré-natais. Essa variação pode estar relacionada com diversos fatores, como: (1) conteúdo heterocromático e eucromático; (2) região cromossômica envolvida; (3) o cromossomo de origem; (4) presença de mosaicismo e (5) presença de dissomia uniparental.

A correlação entre a presença de mosaicismo e a severidade do fenótipo ainda não está bem esclarecida (LIEHR et al., 2004a). No entanto, alguns dados da literatura sugerem uma relação entre esses dois fatores. É classicamente esperado que pacientes que apresentem mosaicismo, com uma das linhagens celulares normal, apresentem fenótipos menos severos. Essa comparação deve ser feita em pacientes que possuem cromossomos marcadores idênticos, para que os efeitos fenotípicos não sejam influenciados por diferenças na composição genética. Sendo assim, os casos familiares de cromossomos marcadores são bastante informativos para essa comparação. Relatos de casos familiares em que um dos pais

possui cromossomo marcador em mosaico com fenótipo normal, cujo filho herda o mesmo marcador em 100% das células do organismo e apresenta fenótipo alterado demonstram que a presença da linhagem normal pode amenizar os efeitos do cromossomo marcador no fenótipo (VIERSBACH_ et al., 1998; ANDERLID et al., 2001).

O mosaicismo pode também se apresentar diferentemente em vários tecidos do corpo, tanto na presença de cariótipos diferentes, quanto na variação no grau de mosaicismo nos diferentes tecidos (FICKELSCHER et al., 2007). Alguns casos já foram descritos, mas o papel dessa variação na severidade do fenótipo permanece desconhecido (WISNIEWSKI e DOHERTY, 1985; CHEN et al., 2004; FICKELSCHER et al., 2007).

O grau de mosaicismo pode também variar de acordo com a origem do cromossomo marcador, especialmente entre cromossomos acrocêntricos e não acrocêntricos. A frequência geral de cromossomos marcadores encontrados em associação com uma linhagem celular normal foi estimada em torno de 46%, e a distribuição foi marcadamente assimétrica, com 30% dos cromossomos marcadores de origem acrocêntrica e 70% dos cromossomos marcadores não acrocêntricos (WARBURTON, 1991; BLENNOW et al., 1994; BRONDUM-NIELSEN e MIKKELSEN, 1995; GRAVHOLT e FRIEDRICH, 1995; HASTINGS et al., 1999). Aproximadamente, 14,7% a 28,6% dos portadores de cromossomos marcadores de origem não acrocêntrica possuem fenótipo anormal, enquanto que 7,1% a 10,9% dos portadores de marcadores de origem acrocêntrica têm alterações fenotípicas (WARBURTON, 1991; CROLLA, 1998b). A frequência de cromossomos marcadores de origem acrocêntrica (aproximadamente 80%) também é marcadamente maior que a frequência de marcadores de origem não acrocêntrica (aproximadamente 20%). Sugere-se então uma correlação estreita entre os cromossomos marcadores de origem não acrocêntrica e a presença de fenótipos mais severos, que podem ser incompatíveis com a vida. Todos esses dados, juntamente com o fato de que é esperado

que a presença de uma linhagem cromossomicamente normal amenize os efeitos fenotípicos causados pela presença desse subgrupo de marcadores, podem explicar a alta frequência de mosaicismos associados à cromossomos marcadores de origem não acrocêntrica.

Grande parte da variabilidade fenotípica observada em pacientes que possuem cromossomos marcadores semelhantes pode ser explicada pelo efeito da dissomia uniparental. O principal mecanismo de formação dos cromossomos marcadores envolve uma quebra cromossômica em regiões proximais ao centrômero, seguida por não-disjunção. No entanto, outros mecanismos foram propostos, entre eles o resgate de trissomia e a complementação gamética (KOTZOT, 2002b) e em ambos, observa-se a coexistência de dissomia uniparental com cromossomo marcador. O efeito patogênico da dissomia uniparental ainda não está totalmente esclarecido, mas algumas explicações foram propostas. Uma delas é o *imprinting* genômico, principalmente em regiões dos cromossomos 6, 7, 11, 14, 15 e 20, em que foi demonstrada a marcação por *imprinting* de genes localizados nessas regiões (CHUDOBA et al., 1999; SHAFFER et al., 2001; KOTZOT, 2002a). Outra explicação é que a dissomia uniparental pode causar homoziguidade de genes recessivos, expondo o fenótipo de doenças recessivas (ENGEL, 1993).

Os cromossomos marcadores originados do cromossomo 15 são os mais comuns (CROLLA, 1998b; FRITZ et al., 2001) e são formados principalmente por duplicações invertidas que envolvem a região 15q11q13, uma região conhecida por sua instabilidade, devido a presença de seqüências de DNA repetitivo (DONLON et al., 1986). A presença da inv dup(15) resulta em tetrassomia de todo braço curto e de parte do braço longo do cromossomo 15, e pode ou não envolver a região crítica das Síndromes de Prader-Willi e Angelman (PWS/AS) (ROBINSON et al., 1993; CHENG et al., 1994; BLENNOW et al., 1995). O fenótipo envolve achados clínicos distintos como hipotonia, deficiência mental e atraso no desenvolvimento, dificuldades para controlar a epilepsia e comportamento autista,

dificuldade de interação social, não utilização funcional de objetos, compreensão limitada e baixa intenção de comunicação. Tomados juntamente, formam um quadro distinto e reconhecível de doença neurogenética, nomeada como síndrome da duplicação invertida do cromossomo 15 (BATTAGLIA, 2005).

Pacientes com marcadores que apresentam trissomia da região 15q11q13 que envolvem a região crítica PWS/AS e pacientes com marcadores formados por inv dup(15) que não envolvem essa região usualmente apresentam fenótipo menos severo ou ausência de alterações, ao passo que o envolvimento dessa região é responsável pelo desenvolvimento de alterações fenotípicas mais graves. O fato da tetrassomia da região crítica PWS/AS ser mais grave que as trissomias sugere um efeito de dosagem de um ou mais genes presentes nessa região (SCHINZEL et al., 1994).

A grande maioria dos cromossomos isodicêntricos (15)(q12 ou q13) são de herança materna, sugerindo que essa aberração herdada do pai é muito rara, tenha efeito letal ou não seja detectada devido a ausência de fenótipo (BROWNE et al., 1997). Genes presentes nessa região têm sua expressão regulada por mecanismos de *imprinting* (DIETRICH et al., 1996) e uma vez que somente aberrações herdadas da mãe têm efeito patogênico, é esperado que genes maternos ajam de maneira dose-dependente e o número de cópias seja crítico para o desenvolvimento normal do cérebro e de seu funcionamento (BATTAGLIA, 2005).

Os pacientes 1 e 5 da amostra analisada no presente estudo apresentam duplicações invertidas do cromossomo 15, possivelmente com tetrassomia da região crítica PWS/AS e possuem fenótipo concordante com os dados clínicos anteriormente descritos em pacientes com esse tipo de aberração cromossômica, como alterações de comportamento, deficiência mental de severa a moderada, atraso no desenvolvimento, convulsões e epilepsia (Anexo IV). No entanto, somente a paciente 5 apresenta dismorfias faciais, enquanto que o paciente 1

possui apenas alterações relacionadas à deficiência mental e epilepsia (Anexo IV), O fenótipo menos grave observado no paciente 1 pode ser explicado pela presença de mosaicismo e também pelas regiões envolvidas no rearranjo. Enquanto o paciente 1 possui tetrassomia da região 15pter-q15, a paciente 5 possui uma alteração que envolve uma região maior, 15pter-q21, e conseqüentemente, um conteúdo gênico maior está presente em tetrassomia. A paciente 7 possui marcador originado do cromossomo 15(pterq21), com trissomia da região crítica PWS/AS. Apesar do ponto de quebra ser o mesmo da paciente 5, o rearranjo resultou apenas em trissomia dessa região. Seu fenótipo inclui, além de crises convulsivas e deficiência mental grave, dismorfias faciais (Anexo IV). Em todos os três pacientes, a técnica de SKY foi informativa para definição da origem do cromossomo marcador e os dados foram validados pela técnica de FISH. A aplicação da técnica de FISH utilizando sonda CEP15 foi fundamental para a identificação de dois centrômeros nos marcadores dos pacientes 1 e 5, definindo-os como cromossomos dicêntricos.

A paciente 10 possui cariótipo 48,XX,+2mar, ambos herdados de seu pai, que possui o mesmo cariótipo. Ambos são fenotipicamente normais (Anexo IV) e os cromossomos marcadores foram caracterizados como derivativos do cromossomo 15, com cariótipos 48,XX,+2der(15)(pterq12) e 48,XY,+2der(15)(pterq12), respectivamente. Nos dois pacientes, a técnica de SKY não foi informativa para a origem dos marcadores, mas a aplicação da técnica de FISH com sonda WCPI5 determinou a origem dos dois cromossomos marcadores, em ambos os pacientes. A duplicação ou triplicação da região 15pterq12 já foi previamente descrita, mas usualmente está associada a fenótipos normais (RIORDAN e DAWSON, 1998), assim como nos presentes pacientes.

Em portadores de cromossomos marcadores, a probabilidade estimada de transmissão para a prole é em torno de 50%. Durante a gametogênese, o marcador provavelmente forma um univalente, sem sinapses com seus cromossomos homólogos,

independentes de quais sejam (GARDNER e SUTHERLAND, 2004). Assim, em torno de 50% dos gametas receberão o marcador, dados corroborados por análises de segregação em espermatozóides de portadores de cromossomos marcadores (MARTIN et al., 1986). COTTER e colaboradores (2000) utilizaram da técnica de FISH para avaliar a segregação meiótica de um homem portador de cromossomo marcador originado do cromossomo 15. Nesse estudo, surpreendentemente, a segregação 1:1 esperada não foi encontrada, sendo que apenas 6,23% dos espermatozóides avaliados era dissômicos para o cromossomo 15. Esses resultados poderiam ser explicados pela presença de mosaicismo tecidual ou perda *in vitro* do cromossomo marcador. Alternativamente, a baixa frequência de dissomia pode representar algum tipo de seleção contra os marcadores durante a meiose e espermatozóides que possuem material genético de apenas um cromossomo 15 teriam vantagens sobre os dissômicos (MARTIN et al., 1993; BISCHOFF et al., 1994).

Os cromossomos marcadores resultantes de translocações são usualmente herdados de um dos pais que possui uma translocação balanceada, por um erro de segregação do tipo 3:1 durante a gametogênese. Esse tipo de segregação pode formar um gameta com 24 ou 22 cromossomos, e conseqüentemente, o conceito terá 47 ou 45 cromossomos. Como regra geral, apenas o embrião com 47 cromossomos é viável. Dois tipos de gametas com 24 cromossomos foram descritos: (1) o mais comum, contendo dois cromossomos normais e um translocado (trissomia terciária) e (2) o mais raro, contendo um cromossomo normal e um translocado (trissomia de troca). É importante salientar que a trissomia terciária somente ocorre quando um dos derivativos é um cromossomo pequeno e assim, quando o gameta contém o derivativo maior, o embrião formado é inviável (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

Os pacientes 6 e 8 da amostra apresentam, respectivamente, cariótipo 47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2) e 47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13), ambos herdados de

portadoras de translocações balanceadas [t(11;22)(q25;q11.2) e t(15;16)(q13;q13)]. O mecanismo proposto como responsável pelo surgimento desses marcadores é a segregação 3:1 com trissomia terciária. Em ambos, o conteúdo cromossômico presente no derivativo era suficientemente pequeno e apresentava composição genética que não acarretou alterações letais, compatíveis com a gestação a termo e nascimento de nascidos vivos.

A translocação balanceada t(11;22)(q23;q11) é a única translocação não-Robertsoniana recorrente descrita na literatura e a progênie de pais assintomáticos pode apresentar cromossomos marcadores derivativos do cromossomo 22 [der(22)t(11;22)(q23;q11)], desenvolvendo um quadro clínico específico denominado Síndrome de Emanuel (ES) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=609029>). As alterações incluem retardo do desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM) e deficiência de crescimento, microcefalia, apêndices pré-auriculares, anomalias de orelha, palato fendido ou ogival, micrognatia, costelas extranumerárias, defeitos cardiovasculares, anomalias renais (hipoplasia ou ausência), malformações anorretais, anomalias genitais em meninos (criptorquidismo, hérnia inguinal, *phallus* pequeno e hipospádia), deslocamento de quadril congênito, hipotonia, convulsões e displasia cerebelar. O paciente 6 possui cariótipo 47,XY,+der(22)t(11;22)(q25;q11.2), semelhante ao encontrado na ES. Seu fenótipo, no entanto, parece ser mais brando do que os pacientes com ES, provavelmente porque neste paciente o ponto de quebra no cromossomo 11 é mais distal, na banda q25, enquanto que na ES o ponto de quebra localiza-se em q23. Mesmo assim, ele apresenta algumas alterações concordantes com a síndrome, como microcefalia, RDNPM e criptorquidismo (Anexo IV). A técnica de SKY foi informativa para determinação da origem e composição do cromossomo marcador desse paciente e os dados foram validados pela técnica de FISH.

O paciente 8 [cariótipo 47,XY,+der(15)t(15;16)(q13;q13)] apresenta trissomia parcial da região 15pter-q13 envolvendo a região crítica PWS/AS. Seu quadro clínico era muito

grave e a criança veio a óbito aos 11 meses de idade. Concomitantemente, o paciente possuía trissomia da região 16q13-qter, um achado comum em abortos, mas extremamente raro em recém-nascidos vivos. Apenas cinco casos foram descritos na literatura e todos apresentavam uma translocação não-balanceada herdada por erros de segregação de um dos pais com translocação balanceada (BUCKTON e BARR, 1981; DAVISON e BEESLEY, 1984; HATANAKA et al., 1984; DOWMAN et al., 1989). Algumas anomalias são reconhecidamente associadas a trissomia 16q13-qter e o paciente 8 apresentava algumas delas, como baixo peso ao nascimento, anomalias de orelha e cardiopatia congênitas, também descritas nos outros 5 casos anteriormente relatados. Alterações genitais, como hipospádia e escroto bifido foram descritas por DAVISON e BEESLEY (1984) e anomalias renais com refluxo vesicoureteral foram relatadas por DOWMAN e colaboradores (1989). As anomalias cerebrais e macrocefalia ainda não foram descritas em pacientes com trissomia 16q13-qter, e no presente caso, podem estar relacionadas à trissomia do cromossomo 15. Para esse paciente, a técnica de SKY foi informativa para determinação da origem e composição do cromossomo marcador e os resultados foram validados pela técnica de FISH.

Cromossomos marcadores originados do cromossomo 4 são raros, sendo treze casos descritos atualmente (CALLEN et al., 1992; CROLLA et al., 1992; BLENNOW et al., 1993; FANG et al., 1995; GRAVHOLT e FRIEDRICH, 1995; CROLLA et al., 1998a; STARKE et al., 2003a; BARTSCH et al., 2005; CROLLA et al., 2005; PIETRZAK et al., 2007). Em dois casos, o cromossomo marcador estava acompanhado por outra aberração cromossômica, um caso com trissomia do cromossomo 21 e fenótipo de Síndrome de Down (STARKE et al., 2003a) e outro caso com um segundo marcador originado do cromossomo 18 (PIETRZAK et al., 2007). Dois casos foram relatados em exames pré-natais, mas em ambos, a gestação foi interrompida e não há dados sobre o feto (STARKE et al., 2003a; CROLLA et al., 1992). Dois casos foram publicados por CROLLA e colaboradores (2005), porém as

alterações fenotípicas não foram descritas. Dos casos com fenótipo alterado, um paciente apresentava deficiência mental moderada e atraso no desenvolvimento, sem outras alterações físicas (CROLLA et al., 1998a) e dois casos foram descritos em exames pré-natais. As duas gestações foram interrompidas, sendo que um feto apresentava holoprosencefalia (BLENNOW et al., 1993) e o outro não apresentava alterações no fenótipo (STARKE et al., 2003a).

Apenas dois pacientes têm uma descrição detalhada das alterações fenotípicas e assim, o quadro clínico específico para esse tipo de alteração ainda não foi determinado. O paciente descrito por CALLEN e colaboradores (1992) apresentava deficiência mental moderada, macrocefalia, plagiocefalia, braquicefalia, epicanto, face achatada com prognatismo, palato alto, lábio superior fino, pescoço curto e largo e mãos e pés pequenos. Já o paciente descrito por FANG e colaboradores (1995) possuía deficiência mental severa, diabetes mellitus insulino-dependente, obesidade, fronte estreita, fissuras palpebrais para baixo, ginecomastia e cifose, dedos finos com clinodactilia bilateral do quinto dedo e sindactilia do segundo e terceiro artelhos. Ambos os pacientes possuíam cromossomo marcador em anel, sendo o primeiro em mosaico. A paciente 4 possui cromossomo marcador originado do 4 envolvendo a região 4p16-q21 e seu fenótipo inclui algumas alterações em comum com os pacientes descritos acima, como deficiência mental, fissuras palpebrais para baixo, clinodactilia, sindactilia e lábio superior fino. Nenhum caso com duplicação 4p16-q21 foi relatado ainda, mas dois casos foram descritos com duplicação de toda a região 4pter-q21; ambos os pacientes apresentavam alterações neurológicas, deficiência motora e malformações cardíacas (HERVA e WENDT, 1978; QAZI et al., 1981). A raridade da trissomia da região 4pter-q21 e de cromossomo marcador originados do cromossomo 4, os poucos dados disponíveis sobre o fenótipo desses pacientes e a ausência de uma caracterização detalhada das regiões envolvidas nesses rearranjos impedem que a

correlação cariótipo-genótipo seja estabelecida, dificultando o prognóstico e o aconselhamento genético desses pacientes e suas famílias.

Cromossomos marcadores originados do cromossomo 9 foram descritos previamente na literatura, sendo aproximadamente 25 casos relatados. Desses, onze casos não apresentavam alterações fenotípicas, sendo que a maioria possuía grande parte da região pericentromérica em trissomia (CALLEN et al., 1991; CALLEN et al. 1992; CROLLA et al., 1992; BLENNOW et al., 1995; JAMES et al., 1995; MÜLLER-NAVIA et al., 1995; CROLLA et al., 1998; HADDAD et al., 1998; STARKE et al., 2002; GUANCIALI-FRANCHI et al., 2004; SANTOS et al., 2007). A região 9p12-q13 foi previamente relatada como uma região não responsável por efeitos clínicos (DIGIACOMO et al., 2004), podendo explicar a ausência de fenótipo nesses pacientes. Sete casos não possuíam descrição do fenótipo, alguns deles encontrados em exames pré-natais em que a gestação foi interrompida (WARBURTON et al., 2004; CROLLA et al., 2005; PAULIS et al., 2006). Os casos com descrição clínica apresentam principalmente deficiência mental e atraso no desenvolvimento, alguns associados a pequenas dismorfias faciais (RAIMONDI et al., 1991; ANDERLID et al., 2001; LANGER et al., 2001; YARDIN et al., 2002; LIEHR et al., 2005; STARKE et al., 2005). No entanto, um quadro clínico específico para esse tipo de alteração não pôde ser definido.

Sendo assim, o foco para a correlação cariótipo-fenótipo das pacientes 2 e 3 baseou-se na descrição de trissomias das regiões envolvidas em seus rearranjos. Elas possuem cromossomos marcadores originados do cromossomo 9, com cariótipos descritos como 47,XX,+der(9)(pterq21) e 47,XX,+der(9)(pterq32), respectivamente. Duplicações de toda essa região não foram encontradas, mas as duplicações da região 9pter-q13 estão associadas a um quadro clínico bem determinado e facilmente reconhecível, descrito em aproximadamente 100 pacientes. Os achados clínicos incluem braqui-microcefalia, fronte saliente, fissuras palpebrais para baixo, miopia, estrabismo, nariz proeminente, hipoplasia dos

músculos periescapulares, cifose e escoliose tóraco-lombar, genitália hipoplásica em meninos, dedos curtos das mãos e pés, clinodactilia do quinto dedo, alteração da mobilidade das articulações dos membros, deficiência mental severa, entre outros (SCHINZEL, 2001). Algumas das características descritas acima foram também encontradas nas pacientes 2 e 3 (Anexo IV), como fronte proeminente, estrabismo, limitações na extensão dos cotovelos e RDNPM grave.

Aproximadamente 50% dos casos de cromossomos marcadores os quais a morfologia pode ser determinada por análises citogenéticas são cromossomos em anel (LIEHR et al., 2006). Eles usualmente são formados por duas quebras cromossômicas, que podem ocorrer no braço curto e braço longo ou em um dos braços e no centrômero, seguidas por fusão das extremidades livres. No entanto, cromossomos marcadores dicêntricos também foram descritos e o principal mecanismo de formação proposto é a formação usual do cromossomo em anel seguido por troca entre cromátides-irmãs (TONNIES et al., 2003). A presença de cromossomos marcadores em anel leva a tetrassomia da região envolvida e o fenótipo de pacientes portadores desse tipo de aberração pode ser mais severamente afetado do que aqueles que possuem trissomia da mesma região. Como os cromossomos marcadores não anéis, durante a segregação há formação de univalente, e assim, 50% dos gametas será dissômico (GARDNER e SUTHERLAND, 2004). A paciente 9 do presente estudo possui um cromossomo marcador em anel, que não foi identificado pela técnica de SKY. A análise em bandeamento DAPI indicou provavelmente a origem acrocêntrica e envolvimento de uma grande região heterocromática, o que pode explicar a dificuldade para definição da origem do marcador pelo SKY. A paciente possui alterações fenotípicas, como RDNPM e dismorfias faciais, e esses dados, juntamente com a observação do cromossomo em anel por bandeamentos GTG e DAPI sugerem a presença de região eucromática. A análise pela técnica de FISH

utilizando as sondas WCPI4 e WCPI5 também não foi informativa para a origem do cromossomo marcador, sendo esta paciente a única da amostra cuja caracterização do marcador não foi determinada.

Alguns cromossomos marcadores são grandes o suficiente para serem identificados pelas técnicas de bandamento GTG, por SKY e CGH metafásico. Outros, no entanto, necessitam de técnicas mais específicas ou de maior resolução, como FISH, cenM-FISH, subcenM-FISH e CGH-array. Assim, um protocolo de investigação para cromossomos marcadores pode ser proposto. Inicialmente, a análise por técnicas de citogenética convencional, que fornece dados importantes em relação ao tamanho, presença de mosaïcismo, presença de centrômero e origem acrocêntrica, e algumas vezes, uma indicação da origem. A partir desses dados, as técnicas de citogenética molecular devem ser indicadas apropriadamente, considerando-se principalmente o tamanho do cromossomo marcador. Para grandes marcadores, a técnica de SKY fornece resultados confiáveis, mas a utilização da técnica de FISH é importante para validação dos resultados. Os pequenos marcadores podem ser identificados por cenM-FISH, subcenM-FISH e CGH-array, e devem também ser validados pela FISH.

Alguns cromossomos marcadores estão diretamente relacionados com síndromes malformativas já descritas e uma correlação cariótipo-fenótipo pode ser determinada. Entre elas, a Síndrome de Pallister-Killian [$i(12p)$], a Síndrome do Olho-de-Gato [$inv\ dup22pter-22q11.2$], a Síndrome iso(18p), a Síndrome de Emanuel [$der(22)t(11;22)(q23;q11)$] e as duplicações invertidas do cromossomo 15 [$inv\ dup(15)$]. No entanto, inúmeros outros casos já foram relatados e a grande maioria permanece sem uma correlação precisa. Isso se deve à grande variação de origem e de regiões envolvidas, à presença de mosaïcismo, à origem parental, entre outros fatores.

A detecção de cromossomos marcadores em exames pré-natais é um dos grandes desafios para o aconselhamento genético, já que dificilmente se pode prever qual o prognóstico fetal. Algumas correlações podem auxiliar, principalmente os estudos que relacionam a origem acrocêntrica ou não com o risco de desenvolvimento de anomalias. Nesses casos, um cálculo empírico pode ser utilizado. Em média, 13% dos casos de cromossomos marcadores estão relacionados com fenótipos alterados, o risco varia entre 14,7% e 28,6% em portadores de cromossomos marcadores de origem não acrocêntrica e entre 7,1% e 10,9% em portadores de marcadores de origem acrocêntrica (WARBURTON, 1991; CROLLA, 1998b) e esses dados podem ser usados para o aconselhamento genético.

Um melhor entendimento e a caracterização dos cromossomos marcadores são fundamentais para orientar o aconselhamento genético, tanto durante o pré-natal, como para uma família que já possui um membro afetado. Assim, é importante que todos os cromossomos marcadores tenham sua origem e composição determinadas, visando o mapeamento gênico de cada região envolvida para futura correlação cariótipo-genótipo-fenótipo.

Conclusões

(1) A utilização das técnicas de citogenética convencional e citogenética molecular (SKY e FISH) permitiu definir a origem dos cromossomos marcadores de dez dos onze pacientes selecionados;

(2) A aplicação da técnica de SKY foi eficiente na determinação da origem de grandes cromossomos marcadores; já pequenos marcadores ou aqueles formados por grandes regiões heterocromáticas necessitam de técnicas com maior resolução, como FISH, cenM-FISH, subcenM-FISH ou CGH-array;

(3) A técnica de FISH foi de extrema importância para validação dos dados gerados pelo SKY e a aplicação deste método com sondas centroméricas foi fundamental para a exclusão de neo-centrômeros e determinação de cromossomos marcadores dicêntricos;

(4) Os resultados obtidos no FISH, no bandejamento GTG e bandejamento DAPI sugeriram os pontos de quebra dos cromossomos marcadores nos quais a origem foi previamente descrita, determinando as regiões em trissomia ou tetrassomia parciais;

(5) O protocolo de investigação de cromossomos marcadores proposto neste trabalho demonstrou-se eficiente, permitindo a caracterização citogenética e definindo o prognóstico e o aconselhamento genético de dez dos onze pacientes avaliados.

Bibliografia Consultada

- AMOR D, BENTLEY K, RYAN J et al. Human centromere repositioning "in progress". **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 101, p. 6542-6547, 2004.
- ANDERLID BM, SAHLEN S, SCHOUMANS J, HOLMBERG E, AHSGREN I, MORTIER G, SPELEMAN F e BLENNOW E. Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. **Am J Med Genet**. v. 99, n. 3, p. 223-233, 2001
- BARTSCH O, LOITZSCH A, KOZLOWSKI P, MAZAUIC M e HICKMANN G. Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43 273 prenatal samples: chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. **Eur J Hum Genet**. v. 13, p. 1192-1204, 2005
- BATTAGLIA A. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognizable neurogenetic disorder. **Brain Develop**. v. 27, p. 365-369, 2005
- BAYANI J e SQUIRE JA. Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. **Clin Genet**. v. 59, n. 2, p. 65-73, 2001
- BAYANI J e SQUIRE JA. Multicolor FISH and spectral karyotyping. In: BEATTY B, MAI S e SQUIRE J. **FISH**. Toronto: Oxford University Press, 2002. p. 205-220.
- BEATTY B, MAI S e SQUIRE JA. **FISH**. Toronto: Oxford University Press, 2002. 255 p.
- BERNARD P e ALLSHIRE R. Centromeres become unstuck without heterochromatin. **Trends Cell Biol**. v. 12, p. 419, 2002.
- BIESECKER LG, ROSENBERG M, DZIADZIO L et al. Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. **Am J Med Genet**. v. 58, p. 389-394, 1995.

- BISCHOFF FZ, NGUYEN DD, BURT KJ e SHAFFER LG. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. **Cytogenet Cell Genet.** v. 66, p. 237-243, 1994.
- BLENNOW E, ANNERÉN G, BUI TH, BERGGREN E, ASADI E, NORDENSKJÖLD M. Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Am J Hum Genet.** v. 53, n. 2, p. 433-442, 1993.
- BLENNOW E, BUI TH, KRISTOFFERSSON U et al. Swedish survey on extra structurally abnormal chromosome in 39 105 consecutive prenatal diagnosis: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. **Prenat Diagn.** v. 14, p. 1019-1028, 1994.
- BLENNOW E, NIELSEN KB, TELENIUS H et al. Fifty probands with extra structurally abnormal chromosome characterized by fluorescence in situ hybridization. **J Med Genet.** v. 55, p. 85-94, 1995.
- BLENNOW E e TILLBERG E. Small extra ring chromosome derived from chromosome 10p: clinical report and characterisation by FISH. **J Med Genet.** v. 33, n. 5, p. 399-402, 1996.
- BRONDUM-NIELSEN K e MIKKELSEN M. A 10-year survey, 1980-1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosome, identified by FISH analysis. Outcome and follow-up of 14 cases diagnosed in a series of 12699 prenatal samples. **Prenat Diagn.** v. 15, p. 615-621, 1995.
- BROWNE CE, DENNIS NR, MAHER E et al. Inherited interstitial duplication of proximal 15q : genotype-phenotype correlations. **Am J Hum Genet.** v. 61, p. 1342-1352, 1997.
- BUCKTON KE e BARR DG. Partial trisomy for long arm of chromosome 16. **J Med Genet.** v. 18, n. 6, p. :483, 1981

- BUCKTON KE, SPOWART G, NEWTON MS et al. Forty four probands with an additional "marker" chromosome. **Hum Genet.** v. 69, n. 4, p. 353-370, 1985.
- CALLEN DF, FREEMANTLE CJ, RINGENBERGS M et al. The isochromosome 18p syndrome: confirmation of cytogenetics diagnosis in nine cases by in situ hybridization. **Am J Hum Genet.** v. 47, n. 3, p. 493-498, 1990.
- CALLEN DF, EYRE HJ, RINGERBERGS ML, FREEMANTLE CJ, WOODROFFE P e HAAN EA. Cromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. **Am J Hum Genet.** v. 48, p. 769-782, 1991.
- CALLEN DF, EYRE H, YIP MY, FREEMANTLE J e HAAN EA. Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. **Am J Med Genet.** v. 43, p. 709-715, 1992.
- CHEN CP, LIN CC, LI YC et al. Clinical, cytogenetic, and molecular analyses of prenatally diagnosed mosaic tetrasomy for distal chromosome 15q and review of the literature. **Prenat Diagn.** v. 24, n. 10, p. 767-773, 2004.
- CHENG SD, SPINNER NB, ZACHARI EH e KNOLL JH. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosome 15 from 11 patients. **Am J Hum Genet.** v. 55, p. 753-759, 1994.
- CHEUNG SW, SHAW CA, YU W et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. **Genet Med.** v. 7, p. 422-432, 2005.
- CHOO KHA. **The Centromere.** New York: Oxford University Press, 1997. 304p.
- CHUDOBA I, FRANKE Y, SENGER G et al. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. **Eur J Hum Genet.** v. 7, n. 5, p. 533-540, 1999.

- CLEMENTINI E, PALKA C, IEZZI I, STUPPIA L, GUANCIALI-FRANCHI P, TIBONI GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. **Hum Reprod.** v. 20, n. 2, p. 437-442, 2005.
- COTTER PD, KO E, LARABELL SK, RADEMARK AW e MARTIN RH. Segregation of a supernumerary del(15) marker chromosome in sperm. **Clin Genet.** v. 58, p. 488-492, 2000.
- CROLLA JA, DENNIS NR e JACOBS PA. A non-isotopic in situ hybridization study of the chromosomal origin of 15 supernumerary marker chromosome in man. **J Med Genet.** v. 29, p. 699-703, 1992.
- CROLLA JA, LONG F, RIVERA H e DENNIS NR. FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases. **Am J Med Genet.** v. 75, n. 4, p. 355-366, 1998a.
- CROLLA JA. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosome excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. **Am J Med Genet.** v. 75, p. 367-381, 1998b.
- CROLLA JA, YOUINGS SA, ENNIS S e JACOBS PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. **Eur J Hum Genet.** v. 13, n. 2, p. 154-160, 2005.
- DANIEL A e MALAFIEJ P. A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. **Am J Med Genet.** v. 117, n. 3, p. 212-222, 2003.
- DAVISON EV e BEESLEY JR. Partial trisomy 16 as a result of familial 16;20 translocation. **J Med Genet.** v. 21, n. 5, p. 384-386, 1984.
- DE LA CHAPELLE A. How do human isochromosomes arise? **Cancer Genet Cytogenet.** v. 5, n. 2, p. 173-179, 1982.

- DEPINET TW, ZACKOWAKI JL, EARNSHAW WC et al. Characterization of neocentromere in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. **Hum Mol Genet.** v. 6, p. 1195-1204, 1997.
- DEWALD GW. Isodicentric X chromosomes in humans: origin, segregation behaviour, and replication band patterns. In: Sandberg AA (ed.) **Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part A.** Liss, New York, 1983, pp 405-426.
- DIGIACOMO MC, CESARANO C, BUKVIC N et al. Duplication of 9p11.2-p13.1: a benign cytogenetic variant. **Prenat Diagn.** v. 24, p. 619-622, 2004.
- DIETRICH B, BUITING K, KORN B et al. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. **Nat Genet.** v. 14, p. 163-170, 1996.
- DONLON TA, LALANDE M, WYMAN A, BRUNS G e LATT SA. Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 83, p. 4408-4412, 1986.
- DOWMAN C, LOCKWOOD D e ALLANSON J. Familial translocation t(9;16). **J Med Genet.** v. 26, n. 8, p. 525-528, 1989.
- ENGEL E. Uniparental disomy revisited: the first twelve years. **Am J Med Genet.** v. 46, p. 670-674, 1993.
- FAN YS SIU VM, JUNG JH, XU J. Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. **Genet Test.** v. 4, p. 9-14, 2000.
- FAN YS. Molecular Cytogenetic in Medicine: An Overview. In: ____: **Methods in Molecular Biology, v. 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications.** Totowa: Humana Press Inc., 2002. p. 3-13.

- FANG YY, EYRE HJ, BOHLANDER SK et al. Mechanisms of small ring formation suggested by the molecular characterization of two small accessory ring chromosomes derived from chromosome 4. **Am J Hum Genet.** v. 57, n. 5, p. 1137-1142, 1995.
- FICKELSCHER I, STARKE H, SCHULZE E et al. A further case with a small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 1 – evidence for high variability in mosaicism in different tissues of sSMC carriers. **Prenat Diagn.** v. 27, n. 8, p. 783-785, 2007.
- FRITZ B, DIETZE I, WANDALL A et al. A supernumerary marker chromosome with a neocentromere derived from 5p14-->pter. **J Med Genet.** v. 38, n. 8, p. 559-565, 2001.
- GARDNER RJM e SUTHERLAND GR. Autosomal Reciprocal Translocations. In:____. **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.** 3° ed, New York: Oxford University Press Inc., 2004. p. 59-97.
- GEKAS J, MEENS R, GONDRY J, MATHIEU M e THEPOT F. Value of karyotyping women patients of couples referred for sterility. **Gynecol Obstet Fertil.** v. 31, p. 66-69, 2003.
- GENTILE M, SUSCA F, RESTA N et al. Infertility in carriers of two bisatellited marker chromosomes. **Clin Genet.** v. 44, p. 71-75, 1993.
- GERSEN SL e KEAGLE MB. **The principles of clinical genetics.** Human Press Inc. Totowa, New Jersey, USA, 1999.
- GRAVHOLT CH e FRIEDRICH U. Molecular cytogenetics study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children. **Am J Med Genet.** v. 56, p. 106-111, 1995.
- GUANCIALI-FRANCHI P, CALABRESE G, MORIZIO E et al. Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis. **Am J Med Genet A.** v. 127, n. 2, p. 144-148, 2004.

- GUTIERRÉZ-ANGULO M, VÁSQUEZ AI, RAMOS AL et al. In search of a 9q13 latent centromere in 9qh polymorphic inversion. **Genet Couns.** v. 12, n. 4, p. 359-362, 2001.
- HADDAD BR, SCHRÖCK E, MECK J et al. Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. **Hum Genet.** v. 103, p. 619-625, 1998.
- HASTINGS RJ, NISBET DL, WATERS K, SPENCER T e CHITTY LS. Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and a review of the literature. **Prenat Diagn.** v. 19, p. 436-446, 1999.
- HATANAKA K, OZAKI M, SUZUKI M, MURATA R e FUJITA H. Trisomy 16q13-qter in a infant from a t(11;16)(q25;q13) translocation-carrier father. **Hum Genet.** v. 65, n. 3, p. 311-315, 1984.
- HERVA R e VON WENDT L. De novo trisomy 4pter-q21. **Hum Genet.** v. 41, p. 225-230, 1978.
- HILLS LV, NOURI S e SLATER HR. Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). **Chromosome Res.** v. 11, n. 4, p. 359-363, 2003.
- HOOKE EB, SCHREINEMACHERS DM, WILLEY AM et al. Rates of mutant structural chromosome rearrangements in human fetuses: data from prenatal cytogenetic studies and associations with maternal age and parental mutagen exposure. **Am J Hum Genet.** v. 35, n. 1, p. 96-109, 1983.
- ISCN – An International System for Human Cytogenetics Nomenclature.** Shaffer LG, Tommerup N (eds); S. Karger, Basel 2005.
- ISHKANIAN AS, MALLOFF CA, WATSON SK et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. **Nat Genet.** v. 36, p. 299-303, 2004.

- JAMES RS, TEMPLE IK, DENNIS NR, CROLLA JA. A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. **Eur J Hum Genet.** v. 3, n. 1, p. 21-26, 1995.
- KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science.** v. 258, n. 5083, p. 818-821, 1992.
- KILLIAN W, TESCHLER-NICOLA M E KILLIAN W. Case report 72: mental retardation, unusual facial appearance abnormal hair. **Synd Ident.** v. 7, p. 6-7, 1981.
- KNEGT AC, LI S, ENGELEN JJM, BIJLSMA EK e WARBURTON PE. Prenatal diagnosis of a karyotypically normal pregnancy in a mother with a supernumerary neocentric 13q21->13q22 chromosome and balancing reciprocal deletion. **Prenat Diagn.** v.23, p. 215-220, 2002.
- KOTZOT D. Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. **Am J Med Genet.** v. 111, n. 4, p. 366-375, 2002a.
- KOTZOT D. Supernumerary marker chromosome (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence? **J Med Genet.** v. 39, n. 10, p. 775-778, 2002b.
- KUMAR C, KLEYMAN SM, SAMONTE RV e VERMA RS. Marker chromosomes in fetal loss. **Hum Reprod.** v. 12, n. 6 ,p. 1321-1334, 1997.
- LANGER PR, WALDROP AA e WARD DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 78, p. 6633-6637, 1981.
- LANGER S, FAUTH C, ROCCHI M, MURKEN J, SPEICHER MR. AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. **Hum Genet.** v. 109, n. 2, p. 152-158, 2001.

- LEE C, GISSELSSON D, JIN C et al. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. **Am J Hum Genet.** v. 68, n. 4, p. 1043-1047, 2001.
- LEVY B, PAPPENHAUSEN PR, TEPPERBERG JH et al. Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication aneuploid marker chromosome. **Cyto Cell Genet.** v. 91 p. 165-170, 2000.
- LIEHR T. Institut für Humagenetik und Anthropologie: Universitätsklinikum Jena. Disponível em: <<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm#Def>>. Acesso em 27 fev 2008.
- LIEHR T e CLAUSSEN U. Current development in human molecular cytogenetics techniques. **Curr Mol Med.** v. 2, p. 283-297, 2002.
- LIEHR T, CLAUSSEN U e STARKE H. Small supernumerary marker chromosome (sSMC) in human. **Cytogenet Res.** v. 107 p. 55-67, 2004a.
- LIEHR T, HICKMANN G, KOZLOWSKI P, CLAUSSEN U e STARKE H. Molecular-cytogenetic characterization of the origin and the presence of pericentromeric euchromatin on minute supernumerary marker chromosomes (SMCs). **Chromosome Res.** v. 12, n. 3, p. 239-244, 2004b.
- LIEHR T, MRASEK K, STARKE H, CLAUSSEN U e SCHREIBER G. Unusual small supernumerary marker chromosome (sSMC) 9 in a Klinefelter patient. **Cytogenet Genome Res.** v. 111, n. 2 p. 179-181, 2005.
- LIEHR T, MRASEK K, WEISE A et al. Small supernumerary marker chromosomes – progress towards a genotype-phenotype correlation. **Cytogenet Genome Res.** v. 112, p. 23-34, 2006.
- LIEHR T e WEISE A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. **Int J Mol Med.** v. 19, n. 5, p. 719-731, 2007.

- MACKIE OGILVIE C, HARRISON RH, HORSLEY SW et al. A mitotically stable marker chromosome negative for whole chromosome libraries, centromere probes and chromosome specific telomere regions: a novel class of supernumerary marker chromosome? **Cytogenet Cell Genet.** v. 92, n. 1-2, p. 69-73, 2001.
- MAKINO T, TABUCHI T, NAKADA K, IWASAKI K, TAMURA S e IIZUKA R. Chromosomal analysis in Japanese couples with repeated spontaneous abortions. **Int J Fertil.** v. 35, p. 266-270, 1990.
- MANENTI E. Two extra inv dup(15) chromosomes and male infertility: second case. **Am J Med Genet.** v. 42, p. 402-403, 1992.
- MANTRIPRAGADA KK, BUCKLEY PG, DE STAHL TD et al. Genomic microarrays in the spotlight. **Trends Genet.** v. 20, n. 2, p. 87-94, 2004.
- MARASCHIO P, TUPLER R, ROSSI E et al. A novel mechanism for the origin of supernumerary marker chromosomes. **Hum Genet.** v. 97, n. 3, p. 382-386, 1996.
- MARTIN RH, HILDEBRAND KA, YAMAMOTO J et al. The meiotic segregation of human sperm chromosomes in two men with accessory marker chromosome. **Am J Med Genet.** v.25 p. 381-388, 1986.
- MARTIN RH, KO E e CHAN K. Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in vitro hybridization (FISH). **Cytogenet Cell Genet.** v. 64, p. 23-26, 1993.
- MARTIN-LUCAS MA, PEREZ-CASTILLO A e ABRISQUETA JA. Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. **Hum Genet.** v. 73, p. 133-136, 1986.
- MCDERMID HE, DUNCAN AMV, BRASCH KR et al. Characterization of the supernumerary chromosome in cat-eye-syndrome. **Science.** v. 232, p. 646-648, 1986.

- MCFADDEN DE e FRIEDMAN JM. Chromosome abnormalities in human beings. **Mutat Res.** v. 396, p. 129-140, 1997.
- MENNICKE K, DIERCKS P, SCHLIEKER H et al. Molecular cytogenetics diagnosis in sperm. **Int J Andr. Suppl.** 3, p. 11-19, 1997.
- MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res.** v. 20, p. 613-616, 1960.
- MRASEK K, STARKE H e LIEHR T. Another small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 2: towards a genotype/phenotype correlation. **J Histochem Cytochem.** v. 53, n. 3, p. 367-370, 2005.
- MÜLLER-NAVIA J, NEBEL A, SCHLEIERMACHER E. Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. **Hum Genet.** v. 96, n. 6, p. 661-667, 1995.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **OMIM**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=609029>. Acesso em: 27 fev 2008.
- NICHOLLS RD. The impact of genomic imprinting for neurobehavioral and developmental disorders. **J Clin Invest.** v. 105, n. 4, p. 413-418, 2000.
- NIETZEL A, ROCCHI M, STARKE H et al. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). **Hum Genet.** v. 108, p. 199-204, 2001.
- PALLISTER PD, MEISNER LF, ELEJALDE BR et al. The Pallister mosaic syndrome. New York: Alan R Liss, for **National Foundation March of Dimes**. BD: OAS XIII (3B). p. 103-110, 1977.

- PASQUALI F, PANARELLO C, BERNASCONI P e CASALONE R. The isochromosome (17q) in chronic myelocytic leukaemia: mechanism of origin, centromeric function and clonal evolution. **Hum Genet.** v. 62,n. 1, p. 89-90, 1982.
- PAULIS M, BENSI M, MORALLI D, DE CARLI L, RAIMONDI E. A set of duplicons on human chromosome 9 is involved in the origin of a supernumerary marker chromosome. **Genomics.** v. 87, n. 6, p. 747-757, 2006.
- PIETRZAK J, MRASEK K, OBERSZTYN E et al. Molecular cytogenetic characterization of eight small supernumerary marker chromosomes originating from chromosomes 2, 4, 8, 18, and 21 in three patients. **J Appl Genet.** v. 48, n. 2, p. 167-175, 2007.
- PINKEL D, STRAUME T e GRAY JW. Cytogenetics analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PINKEL D, SEGRAVES R, SUDAR D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nat Genet.** v. 20, p. 207-211, 1998.
- QAZI QH, MADAHAR C, KANCHANAPOOMI R, PRICE W, CHUA A e BELLER E. Partial chromosome 4 trisomy. **Clin Genet.** v. 20, p. 179-184, 1981.
- RAIMONDI E, BERNASCONI P, MORALLI D et al. Localization of DNA probes tightly linked to the Friedreich's ataxia locus by in situ hybridization in a case of pericentric inversion of chromosome 9. **Hum Genet.** v. 86, n. 5, p. 525-528, 1991.
- RICKMAN L, FIEGLER H, SHAW-SMITHEC et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. **J Med Genet.** v. 43, p. 353-361, 2006.
- RIORDAN D e DAWSON AJ. The evaluation of 15q proximal duplications by FISH. **Clin Genet.** v. 54, n. 6, p. 517-521, 1998.

- ROBINSON WP, BINKERT F, GINE R et al. Clinical and molecular analysis of five inv dup(15) patients. **Eur J Hum Genet.** v. 1, p. 37-50, 1993.
- SACHS ES, VAN HEMEL JO, DEN HOLLANDER JC et al. Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow-up studies. **Prenat Diagn.** v. 7, n. 2, p. 81-89, 1987.
- SAHOO T, CHEUNG SW, WARD P et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. **Genet Med.** v. 8, p. 719-727, 2006.
- SANTOS M, MRASEK K, RIGOLA MA, STARKE H, LIEHR T, FUSTER C. Identification of a "cryptic mosaicism" involving at least four different small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 9 in a woman without reproductive success. **Fertil Steril.** v. 88, n. 4, p. 969, 2007.
- SCHERES JM. Human chromosome banding. **Lancet.** v. 1, n. 7755, p. 849, 1972.
- SCHEURLLEN WG, SCHWABE GC, SERANSKI P et al. Mapping of the breakpoints on the short arm of chromosome 17 in neoplasms with an i(17q). **Genes Chromo Cancer.** v. 25, n. 3, p. 230-240, 1999.
- SCHINZEL A, SCHMID W, FRACCARO M et al. The cat-eye-syndrome: dicentric small marker chromosome probably derived from a n°:22 (tetrasomy 22pterq11) associated with a characteristic phenotype. **Hum Genet.** v. 57, p. 148-158, 1981.
- SCHINZEL A, BREVEVIC L, BERNASCONI F et al. Intrachromosomal triplication of 15q11-q13. **J Med Genet.** v. 31, p. 798-803, 1994.
- SCHINZEL A. **Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man.** 2° ed. New York: Walter de Gruyter GmbH & Co. 2001. 966p.

- SCHINZEL A e NIEDRIST D. Chromosome imbalances associated with epilepsy. **Am J Med Genet.** v. 106, p. 119-124, 2001.
- SCHRÖCK E, DE MANOIR S, VELDMAN T et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science.** v. 273, p. 494-497, 1996.
- SCHUFFENHAUER S, KOBELT A, DAUMER-HAAS C, LOFFLER C, MULLER G, MURKEN J e MEITINGER T. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. **Am J Med Genet.** v. 65, n. 1, p. 56-59, 1996.
- SCHWARZACHER T e HESLOP-HARRISON P. **Practical in situ hybridization.** Oxford: Bios Publisher Limited, 2000. 203p.
- SHAFFER LG, LEDBETTER DH, LUPSKI JR. Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D (eds). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** New York: Mcgraw-Hill, 2001. p. 1291-324.
- SHAFFER LG, KASHORK CD, SALEKI R et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities. **J Pediatr.** v. 149, p. 98-102, 2006.
- SIGNATURE GENOMICS LABORATORIES, LLC. Disponível em: <<http://www.signaturegenomics.com/>>. Acesso em 27 fev 2008.
- SNIJDDERS AM, NOWAK N, SEGRAVES R et al. Assembly to microarray for genome-wide measurement of DNA copy number. **Nat Genet.** v. 29, p. 263-264, 2001.
- SOLINAS-TOLDO S, LAMPEL S, STILGENBAUER S et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. **Genes Chromo Cancer.** v. 20, p. 399-407, 1997.

- STARKE H, MITULLA B, NIETZEL A, HELLER A, BEENSEN V, GROSSWENDT G, CLAUSSEN U, VON EGGELING F e LIEHR T. First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. **Am J Med Genet A**. v. 116, n. 1, p. 26-30, 2003a .
- STARKE H, NIETZEL A, WEISE A et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. **Hum Genet**. v. 114, n. 1, p. 51-67, 2003b.
- STARKE H, MRASEK K, LIEHR T. Three cases with enlarged acrocentric p-arms and two cases with cryptic partial trisomies. **J Histochem Cytochem**. v. 53, n. 3, p. 359-360, 2005.
- TONNIES H, HENNIES H-C, SPOHR HL e NEITZEL H. Characterization of the first supernumerary tricentric ring chromosome 1 mosaicism by conventional and molecular cytogenetic techniques. **Cytogenet Genome Res**. v. 103, p. 28-33, 2003.
- TONNIES H, GERLACH A, HEINEKING B, STARKE H, NEITZEL H e NEUMANN LM. Molecular cytogenetic identification and characterization of a de novo supernumerary neocentromeric derivative chromosome 13. **Cytogenet Genome Res**. v. 114, n. 3-4, p. 325-329, 2006.
- TRASK BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends Genet**. v. 7, n. 5, p. 149-154, 1991.
- TYLER-SMITH C, GIMELLI G, GIGLIA S et al. Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations. **Am J Hum Genet**. v. 64, p. 1440-1444, 1999.
- UHRIG S, SCHUFFENHAUER S, FAUTH C et al. Multiplex-FISH for pre- and posnatal diagnostic applications. **Am J Hum Genet**. v. 65, p. 448-462, 1999.
- VELDMAN T, VIGNON C, SCHRÖCK E, ROWLEY JD e RIED T. Hidden chromosome abnormalities in hematological malignancies. **Nat Genet**. v. 15, p. 406-410, 1997.

- VIERSBACH R, ENGELS H, GAMERDINGER U e HANSMANN M. Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. **Am J Med Genet.** v. 76, n. 4, p. 351-358, 1998.
- VOULLAIRE LE, SLATER HR, PETRAVI V e CHOO KHA. A functional marker chromosome with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? **Am J Hum Genet.** v. 52, p. 1153-1163, 1993.
- WARBURTON D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. **Am J Hum Genet.** v. 49, n. 5, p. 995-1013, 1991.
- WARBURTON PE. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. **Chromo Res.** v. 12, p. 617-626, 2004.
- WARD BE, HAYDEN MW e ROBINSON A. Isochromosome 12p mosaicism (Pallister-Killian Syndrome): newborn diagnosis by direct bone marrow analysis. **Am J Med Genet.** v. 31, p. 835-839, 1998.
- WENGER SL, BOONE LY e STEELE MW. Mosaicism in Pallister i(12p) syndrome. **Am J Med Genet.** v. 35, n. 4, p. 523-525, 1990.
- WISNIEWSKI LP e DOHERTY RA. Supernumerary microchromosomes identified as inverted duplications of chromosome 15: a report of three cases. **Hum Genet.** v. 69, n. 2, p. 161-163, 1985.
- YARDIN C, ESCLAIRE F, TERRO F, BARTHE D, GILBERT B. Reevaluation twenty-three years later of a supernumerary derivative chromosome 9. **Am J Med Genet.** v. 111, n. 2, p. 213-214, 2002.
- YU W, BALLIF BC, KASHORK CD et al. Development of comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. **Hum Mol Genet.** v. 12, p. 2145-2152, 2003.

Anexos

ANEXO I



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Fone: (16) 3602-2228 / Fax: (16) 3633-1144
cep@hcrp.fmrp.usp.br www.hcrp.fmrp.usp.br

Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2006

Ofício nº 1719/2006
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 15350/2005

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado “**DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO MOLECULAR DE MATERIAL CROMOSSÔMICO ADICIONAL**”, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 227ª Reunião Ordinária realizada em 12/06/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
ANA CAROLINA LAUS
PROF^a DR^a LÚCIA REGINA MARTELLI (Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP
Em mãos

ANEXO II

excelência desde 1956



Mem. nº 181/2007
GS-3.3/SMFK

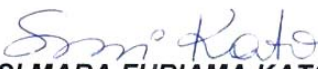
Ribeirão Preto, 09 de março de 2007

Ilustríssima Senhora
ANA CAROLINA LAUS
PROF^a. DR^a. LÚCIA REGINA MARTELLI(Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP

Prezada Senhora,

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer CONEP nº 207/2007, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "**DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO MOLECULAR DE MATERIAL CROMOSSÔMICO ADICIONAL**", de acordo com o Processo HCRP nº 15350/2005.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.
Atenciosamente.


SUSI MARA FURIAMA KATO
Encarregada do Setor de Comissões
R.F. nº 7882

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando seu filho(a) para participar de um projeto de pesquisa do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, intitulado “ESTUDO CITOGENÉTICO MOLECULAR DE MATERIAL CROMOSSÔMICO ADICIONAL”, pesquisadora responsável Ana Carolina Laus. O objetivo desse estudo é avaliar a constituição genética do paciente para podermos explicar seus sintomas. Para isso, será necessária a coleta de uma amostra de sangue, que pode causar algum desconforto, mas sem nenhum risco para a saúde. O exame que será realizado irá avaliar todos os cromossomos da criança e se mudanças nesses cromossomos podem explicar o atraso do desenvolvimento e as alterações observadas no seu filho(a).

Informamos que:

1. A participação de seu filho(a) é espontânea e opcional;
2. Caso você decida não participar, ou desista de participar da pesquisa a qualquer momento, a criança não perderá nenhum benefício ou tratamento que estiver fazendo neste Hospital;
3. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre as alterações genéticas que podem afetar o desenvolvimento normal de uma criança.
Se você concordar que seu filho(a) participe da pesquisa, informamos que:
4. Os resultados de nosso estudo não trarão benefício direto para o tratamento de seu filho(a), mas fornecerão dados para o aconselhamento genético, determinando os riscos de ocorrer novamente a doença na futura descendência do casal. Tanto o aconselhamento genético como o tratamento do(a) paciente, serão realizados no Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP;
5. Os resultados demoram algumas semanas ou meses para ficarem prontos e serão colocados em seu prontuário médico;
6. O material genético extraído das amostras será utilizado exclusivamente para este fim e sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

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

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Nome completo e assinatura do(a) paciente ou responsável

Pesquisadores responsáveis:

Ana Carolina Laus
(16) 3602 3081

Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli
(16) 3602 3671

ANEXO IV

Paciente I- DB

Data de nascimento: 29/08/81 – 26 anos

Sexo masculino

Cariótipo 1776

Quadro Clínico Resumido:

- Deficiência mental e atraso na fala.
- Frontal proeminente com face alongada, presença de sinofre; palato estreito, arcada dentária pequena com dentes apinhados, orelhas em abano, prega de transição em mão direita, frouxidão ligamentar distal, nevos hiperocrômicos, mancha hiperocrômica em dorso.
- A partir dos 24 anos, começou a apresentar crises convulsivas de difícil controle.
- Alterações de comportamento, isolamento social.
- EEG compatível com encefalopatia difusa inespecífica, epilepsia focal sintomática e crises eletroclínicas.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 2 - BS

Data de nascimento: 02/12/92 – 15 anos

Sexo feminino

Cariótipo 2276

Quadro Clínico Resumido:

- RDNPM
- Assimetria craniana; fronte proeminente; fenda palpebral discretamente para baixo; raiz nasal alta; retrognatia; orelhas com implantação baixa e rodadas, sendo a esquerda maior que a direita e em abano; pilificação cervical; *pectus excavatum*; hiperextensão articular; prega única na mão direita; clinodactilia; desvio ulnar discreto em quarto dedo da mão; pés com braquidactilia.
- Aos 15 anos, possui boa compreensão, sem crises convulsivas e irritabilidade.
- P=39400g e E=149cm.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 3 - AHRS

Data de nascimento: 02/05/94 – 13 anos

Sexo feminino

Cariótipo 2729

Encaminhamento: RDNPM. Sentou com 1 ano e 2 meses, engatinhou aos 2 anos, andou com 4 anos e disse a primeira palavra aos 4 anos. Ao nascimento: P = 3200g e E = 50cm.

Quadro Clínico Resumido:

- Face assimétrica, sendo o lado direito maior que o esquerdo; telecanto aparente; estrabismo; raiz nasal alta com columela saliente; orelhas baixo implantadas; retrognatia importante; cúbito valgo bilateral; limitação da extensão do cotovelo esquerdo.
- Deformidade óssea em membros superiores. Luxação do cotovelo esquerdo, ulna esquerda encurtada e alargada na porção proximal. Ausência do terço distal da ulna direita e deformidade da extremidade proximal do rádio direito. Diferença significativa no comprimento dos membros superiores, sendo o direito maior que o esquerdo, aproximadamente 3,5cm. Espinha bífida L5-S1.
- Ressonância Magnética (RM) do crânio apresentou aumento das dimensões ventriculares e cisto aracnóide temporal direito.
- Ultrasonografia de abdome normal.
- Ecocardiograma normal.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 4 - ALAS

Data de nascimento: 24/05/00 – 7 anos

Sexo feminino

Cariótipo 2765

Encaminhamento: Craniosinostose.

Quadro Clínico Resumido:

- Crânio microcefálico com abaulamento bitemporal; fissura metópica espessada; fendas palpebrais oblíquas para baixo; sinofre; dorso nasal alargado; orelhas baixo implantadas; boca pequena; lábios finos; clinodactilia; sindactilia cutânea bilateral de 2° e 3° pododáctilos; pés plantígrafos.
- Suspeita de craniosinostose afastada após investigação radiológica.
- RM do Encéfalo mostrou discreta perda de volume cerebral.
- Raio X de coluna evidenciou espinha bífida sacral, 11 arcos costais e 6 vértebras lombares, cifose torácica e escoliose tóraco-lombar sinistro convexa.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 5 - RRC

Data de nascimento: 01/06/92 – 15 anos

Sexo feminino

Cariótipo 2866

Encaminhamento: RDNPM grave e crises convulsivas.

Quadro Clínico Resumido:

- Epilepsia, agressividade, hiperatividade, não fala, não controla esfíncteres.
- Epicanto bilateral; hipertelorismo; fendas palpebrais horizontais; raiz nasal baixa e alargada com base ascendente; narinas antevertidas; boca constantemente aberta; hiperplasia gengival com palato alto e implantação anômala dos dentes; orelha esquerda baixo implantada.
- Hiperpigmentação cervical e dos membros.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 6 - NAO

Data de nascimento: 21/08/02 – 5 anos

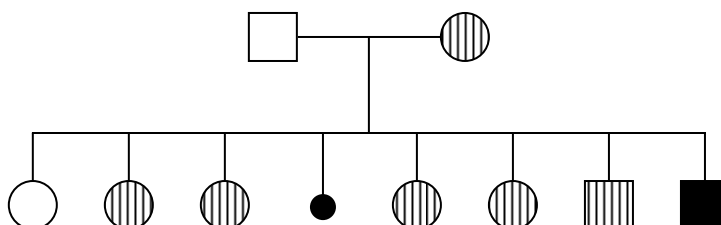
Sexo masculino


Cariótipo 3405

Quadro Clínico Resumido:

- Microcefalia; frontal estreito; face assimétrica em detrimento do lado esquerdo; fendas palpebrais oblíquas para cima; esclera azulada; epicanto; dentes afastados e irregulares; *pectus excavatum* e tórax em escudo; hipertelorismo mamilar; criptorquidia; frouxidão ligamentar; escoliose.
- Gastrostomia; traqueostomia até os 5 anos; pneumonias de repetição; crises cianóticas, decorrentes dos problemas pulmonares (engasgos).

História Familiar: Pais não consangüíneos, com resultado do exame de cariótipo do pai normal e da mãe apresentando uma translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 11 e 22 e fenótipo normal. O casal possui mais seis filhos com fenótipos normais, sendo que quatro meninas e um menino apresentam a mesma translocação da mãe e uma menina apresenta cariótipo normal. Antecedente de um aborto espontâneo. Mãe com 41 anos ao nascimento do filho afetado.



 - Portador de translocação aparentemente balanceada t(11;22)

 - Afetado

 - Aborto

Paciente 7 - BGS

Data de nascimento: 23/02/02 – 6 anos

Sexo feminino

Cariótipo 4543

Encaminhamento: RDNPM. Até os 5 meses de vida, os pais não notaram nenhuma alteração na criança, quando teve uma crise convulsiva e de choro por uma semana e meia. Pais relatam que a partir desse episódio, houve grande regressão neurológica.

Quadro Clínico Resumido:

- Hipotonia; epicanto; dorso nasal alargado; assimetria do lábio superior (hemangioma); dentes apinhados; palato estreito e alto; face alongada; mama um pouco saliente; prega palmar acessória; mácula hiperocrômica em região inguinal esquerda.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 8 - VMB

Data de nascimento: 02/08/06

Data de óbito: 14/07/07

Sexo masculino

Cariótipo 5082

Resumo do Quadro Clínico:

- Deficiência de crescimento intrauterino detectado pela US; gestação sem complicações e parto cesária devido estresse fetal; P=1270g, PC=29cm, Apgar 3-7.
- Ao nascimento apresentava macrocefalia; sopro sistólico; genitália ambígua, com phallus reduzido, hipospádia penoscrotal, escroto bífido e uma gônada palpável.
- ECG compatível com Tetralogia de Fallot.
- Tomografia do crânio: dilatação bilateral dos ventrículos e hematoma extradural occipital.
- US abdome normal.
- Presença de refluxo vesicoureteral.
- Óbito aos 11 meses de vida.

História Familiar: Pais não consangüíneos, com resultado do exame de cariótipo do pai normal e da mãe apresentando um translocação aparentemente balanceada 46,XX,t(15;16)(q13;q13).

Paciente 9 - MCO

Data de nascimento: 20/01/03 – 5 anos

Sexo feminino

Cariótipo 5146

Encaminhamento: RDNPM, sustento cefálico aos 5 meses, engatinhou aos 10 meses, andou ao 1 ano e 1 mês e disse a primeira palavra com 1 ano, no entanto ainda não forma frases. Aos 20 dias de vida teve pneumonia aspirativa, ficou no CTI por 20 dias e apresentou convulsões.

Quadro Clínico Resumido:

- Fronte proeminente com hipertricose; aparente telecanto (DII=3cm); terço lateral das sobrancelhas esparsas; raiz e dorso nasal largos com columela curta; sobredobramento de hélices; fosseta auricular bilateral; nevo melanocítico com hipertricose em braço direito de aproximadamente 2 cm; pescoço curto.
- Aos 4 anos: P=17000g, E=120cm e PC=49cm.

História Familiar: Pais não consangüíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Paciente 10 e 11 - ACP

Data de nascimento: 31/05/06 – 1 ano

Sexo feminino

Cariótipo 5179

Quadro Clínico Resumido:

- Criança sem alterações fenotípicas ao exame físico, sem dismorfias e malformações.
- Bom desenvolvimento
- Aos 11 meses: P=11000g. Sobrepeso.

História Familiar: Pais não consangüíneos, com resultado do exame de cariótipo da mãe normal e do pai 48,XY,+2mar. No entanto, o fenótipo do pai não apresentou alterações ao exame físico.

Artigo para Publicação

Molecular cytogenetics of a Kabuki syndrome patient with ring Y chromosome duplication

Ana Carolina Laus^a, Charles Marques Lourenço^b, Maisa Yoshimoto^c, Juliana Fabrícia Cuzzi^a, Ester Silveira Ramos^{a,b}, Maria Silvina Juchniuk de Vozzi^a, Jeremy A. Squire^{c,d}, Lucia Martelli^{a,b}.

(a) Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

(b) Medical Genetics Division, Clinical Hospital of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

(c) Division of Applied Molecular Oncology, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, Canada.

(d) Departments of Laboratory Medicine and Pathobiology, and Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

Corresponding author: **MD PhD Lúcia Martelli**

Genetics Department

School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Av. Bandeirantes, 3900. Monte Alegre. Zip Code: 14040-030.

Ribeirão Preto, SP. Brazil. Phone: 55-16-3602-3076. Fax: 55-16-3633-0069.

E-mail: irmartel@fmrp.usp.br

Short title: **Ring Y chromosome in Kabuki syndrome**

ABSTRACT

Kabuki syndrome (KS) is a multiple congenital anomalies syndrome, characterized by a peculiar facial appearance, short stature, skeletal anomalies, dermatoglyphic abnormalities, fetal fingertip pads and mental retardation. A strong association with sex chromosome aberration was reported before, although many patients showed aberrations involving autosomal chromosomes or normal karyotype. However, the correlation between the KS phenotype and specific chromosomal aberrations remains unclear. We investigated one patient diagnosed with KS by conventional cytogenetic techniques, Comparative Genomic Hybridization (CGH) and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). The karyotype was defined as 45,X[36]/46,X,+r(Y)(p11.3q12)dup(Y)(q11.2q12)[64], with Yq duplication and CGH analysis did not detect any imbalances. FISH analysis using WCP Y probe confirmed the origin of the ring. FISH using pseudoautosomal *PAR1* X/Y probe showed two signals corresponding to the normal X chromosome (Xp22.3) and to the distal region of Y (Yp11.3). Whilst there is presently little direct evidence implicating a specific region of the sex chromosomes in the etiology of this syndrome, it is clear that pseudoautosomal region *PAR1* would be attractive candidate region for involvement because of the high frequency of aberrations and rings affecting both the X and Y chromosomes. Aberrant inter and intrachromosomal rearrangements within *PAR1* sequences might be more frequent in KS leading to an association with sex chromosome rearrangements.

Keywords: CGH, Kabuki syndrome, mosaicism, ring Y chromosome.

INTRODUCTION

Kabuki syndrome (KS) is a multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome of unknown cause, first described simultaneously by Niikawa et al [1] and Kuroki et al [2]. It is characterized by a peculiar facial appearance, short stature, skeletal anomalies, dermatoglyphic abnormalities, and mental retardation. Characteristic facial features include long palpebral fissures with eversion of the lateral one-third of the lower eyelid, arched eyebrows with sparseness of the lateral one-third, short columella with depressed nasal tip, and prominent ears. The male to female ratio among 251 reported patients was 1.16 to 1. Most cases are sporadic, but at least 14 familial cases have been reported [3].

Although most patients with KS show normal karyotypes, some affected individuals with a chromosome abnormality have been reported, including sex chromosome alterations [4; 5; 6]. Recently, metaphase Comparative Genomic Hybridization (CGH), array based Comparative Genomic Hybridization (arrayCGH) and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) have been used to detect genomic alterations which could be associated with KS [7; 8; 9]. However, a precise relationship between the etiology of the KS phenotype and specific chromosomal aberrations remains unclear. In this study, we report the conventional and molecular cytogenetic findings of a patient with a clinical diagnosis of KS who also presented sex chromosomal mosaicism.

CASE REPORT

The patient is a 7 years-old boy, second child of a young, no consanguineous couple, with no familial history of congenital anomalies or mental retardation. He was referred for investigation due to growth deficit and learning disabilities. The proband was born to a 30 years old G3P2A1 woman at 42 weeks gestation after an uncomplicated pregnancy, weighting 2,800g, stature of 45cm, Apgar scores 9 and 10. The physical examination showed

weight = 17kg (p3-p10), height=107cm (<3rd percentile), OFC= 50,5cm (p3-p50), low posterior hair line, long palpebral fissures, eversion of lower eyelids, arched eyebrows, hypertelorism, long eyelashes, fingertip pads and brachydactyly type V (Fig.1). Normal male genitalia. Abdominal ultrasonography, urethrocytography, hormone levels and echocardiography did not show any abnormality.

CYTOGENETIC ANALYSIS

Peripheral blood lymphocyte culture was prepared according to standard methods. One hundred metaphases were analyzed by GTG and CBG-banding techniques.

Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis using normal male metaphase spreads was prepared following published methods [10]. Genomic DNA was isolated from peripheral blood, quantified by spectrophotometry and assessed by gel electrophoresis. Because the amount of DNA was limited, it was amplified by Single Cell Comparative Genomic Hybridization (SCOMP) [11]. The CGH assay was carried out as described by Klein et al. [11].

The FISH technique using spectrum green WCP Y probe (Cytocell Technologies, UK) and spectrum green pseudoautosomal region probe (*PAR1*) X/Y (Vysis Inc., IL, USA) was performed according to the manufacturer's protocol. Twenty metaphases and fifty interphase nuclei were analyzed.

RESULTS

The GTG-banding technique revealed chromosomal mosaicism, with 64% of the metaphases carrying a ring chromosome of unknown origin. The other 36% of the cells presented 45,X chromosomes. CBG-banding indicated one centromere and two heterochromatin regions in the ring. The final karyotype was

45,X[36]/46,X,r(Y)(p11.3q12)dup(Y)(q11.2q12)[64] (Figs.2a; 2b). The CGH analysis did not detect any imbalance.

Further characterization by FISH using WCP Y probe showed that all the metaphases with the ring chromosome presented a single signal corresponding to the entire ring, confirming its origin from the Y chromosome (Fig.3a). FISH characterization using pseudoautosomal X/Y probe presented two signals on the ring, corresponding to two sister chromatids, indicating that this region was not duplicated, and two signals corresponding to the normal X chromosome (Fig. 3b).

DISCUSSION

The combination of Kabuki syndrome phenotype and structurally rearranged sex chromosome has previously been reported by Niikawa et al. [4] and McGinniss et al. [6]. In this report, we describe a patient with 45,X/46,X,+r(Y) karyotype presenting normal male genitalia. Standard cytogenetics analysis of the ring chromosome suggested the ring arose by partial duplication of Y chromosome. FISH results confirmed the origin of Y chromosome material and revealed the presence of one signal corresponding to pseudoautosomal region located on the distal region of Yp arm. The absence of a second pseudoautosomal signal in the ring confirmed the duplication of only Yq.

Lymphocytes were mosaic with 64% of cells having the ring chromosome containing the duplicated Y. The remaining 36% of cells were 45,X and additional Y genomic content was insufficient to indicate gain following CGH analysis. Our findings suggest that the sensitivity of CGH would not be adequate to detect small percentages of gain [12]. In spite of monosomic cell line, the patient did not present ambiguous genitalia and/or Turner syndrome stigmata.

Many studies have reported an association between diverse chromosomal aberrations and KS, but at present, there is no direct evidence in support of causation. Milunsky and Huang [7] described six KS patients with duplication at 8p22-p23.1 using CGH and FISH analysis, but these findings could not be substantiated in other studies [8; 13]. Schoumans et al [13] performed array-based CGH and did not detect gene dose alterations at 8p in ten patients. These findings suggest that KS with 8p duplication may represent a specific clinical subgroup [8].

The literature indicates there could be a strong association between KS and sex chromosome abnormalities. One KS patient presented a translocation between X and Y chromosome [14], two had a karyotype 45,X overlapped with Turner Syndrome phenotype [15, 16], six presented ring chromosome X and one had a Y ring chromosome [4, 5, 6, 17]. Of these, at least seven patients showed mosaic karyotype affecting sex chromosomes in peripheral blood cells. Consistent with the general association between mosaicism and abnormalities of sex chromosomes, our patient is mosaic with a duplicated Y ring chromosome. We, therefore, postulate the follows sequence of events leading to this karyotype. First, there is an early somatic non-disjunction of the Y chromosomes leading to 45,X and 47,XYY progenities. In the lineage with two Y chromosomes, a deletion of Yp is followed by the rearrangement with the intact Y chromosome. Thereafter, fusion of telomeric p and q regions occurs to generate the duplication within the ring chromosome. Whilst there is presently little direct evidence implicating a specific region of the sex chromosomes in the etiology of this syndrome, it is clear that PARI would be attractive candidate region for involvement because of the high frequency of aberrations and rings affecting both the X and Y chromosomes. The region of homology within PARI extends for ~2,6Mb and contains ~22 genes. Aberrant inter and intrachromosomal rearrangements

within PARI sequences might be more frequent in KS justifying the association with sex chromosome rearrangements and rings.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (LAUS, AC scholarship), CAPES/PROEX, FAEPA-HCFMRP – University of Sao Paulo and by grants from the National Cancer Institute with funds from the Canadian Cancer Society.

REFERENCES

- 01 Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T. Kabuki make-up syndrome: a syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. *J Pediatr* 1981; 99 (4): 565-569.
- 02 Kuroki Y, Suzuki Y, Chyo H, Hata A, Matsui I. A new malformation syndrome of long palpebral fissures, large ears, depressed nasal tip, and skeletal anomalies associated with postnatal dwarfism and mental retardation. *J Pediatr* 1981; 99 (4): 570-573.
- 03 Matsumoto N, Niikawa N. Kabuki make-up syndrome: a review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003; 117 (1): 57-65.
- 04 Niikawa N, Kuroki Y, Kajii T, et al. Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. *Am J Med Genet* 1988; 31 (3): 565-589.
- 05 Dennis NR, Collins AL, Crolla JA, Cockwell AE, Fisher AM, Jacobs PA. Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. *J Med Genet* 1993; 30 (6): 482-486.
- 06 McGinniss MJ, Brown DH, Burke LW, Mascarello JT, Jones MC. Ring chromosome X in a child with manifestations of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 70 (1) 37-42.
- 07 Milunsky JM, Huang XL. Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23.1 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. *Clin Genet* 2003; 64 (6): 509-516.
- 08 Hoffman JD, Zhang Y, Greshock J, et al. Array based CGH and FISH fail to confirm duplication of 8p22-p23.1 in association with Kabuki syndrome. *J Med Genet* 2005; 42 (1): 49-53.

- 09 Miyake N, Shimokawa O, Harada N et al. No detectable genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome patients. *Am J Med Genet* 2006; 140 (3): 291-293.
- 10 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
- 11 Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96 (8): 4494-4499.
- 12 Hodgson G, Hager JH, Volik S, et al. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet* 2001; 29 (4): 459-464.
- 13 Schoumans J, Nordgren A, Ruivenkamp C, et al. Genome-wide screening using array-CGH does not reveal microdeletions/microduplications in children with Kabuki syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005; 13 (2): 260-263.
- 14 Moncla A, Sigaudy S, Mattei MG, Simonin G, Philip N. Features of Kabuki syndrome in a patient with a X-Y translocation. *Eur J Hum Genet* 1996; 4 (Suppl):144.
- 15 Wellesley DG, Slaney S. Kabuki make-up and Turner syndromes in the same patient. *Clin Dysmorphol* 1994; 3 (4): 297-300.
- 16 Abd SE, Wilson L, Howlin P, Patton MA, Wintgens AM, Wilson R. Agenesis of the corpus callosum in Turner syndrome with ring X. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39 (2): 119-24.
- 17 Stankiewicz P, Thiele H, Giannakudis I, et al. Kabuki syndrome-like features associated with a small ring chromosome X and XIST gene expression. *Am J Med Genet* 2001; 102 (3): 286-292.

LEGENDS OF FIGURES

Fig.1: Patient facial appearance.

Fig.2: GTG-banding karyotype showing (a) a metaphase carrying the ring chromosome [46,X,+r(?)] and (b) a metaphase with 45,X karyotype.

Fig.3: (a) FISH using WCP Y probe showing a single sign corresponding to the entire ring chromosome; (b) FISH using pseudoautosomal region probe *PAR1*, presenting two signals in

X normal chromosome and two signals in the ring chromosome, corresponding to two sister chromatids.

FIGURES

Figure 1



Figure 2a and 2b

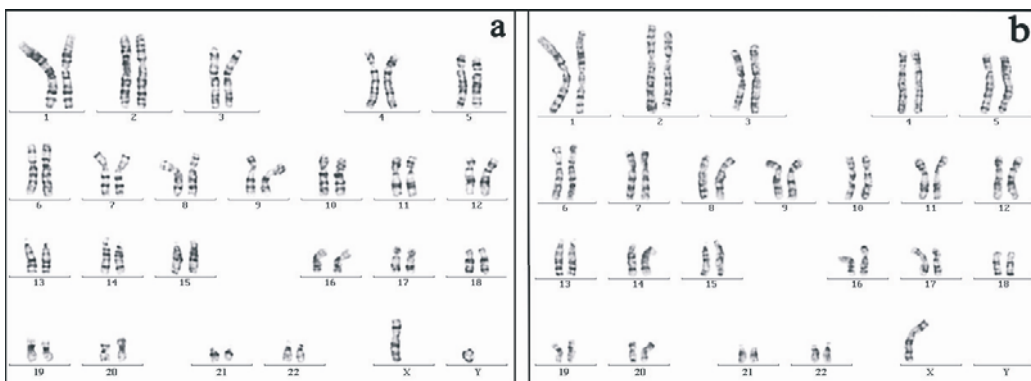


Figure 3a and 3b

