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

ALEXANDRA GALVÃO GOMES

Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

ALEXANDRA GALVÃO GOMES

Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas

Cytogenomic characterization of chromosomal aberrations

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

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Alexandra Galvão

Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas. Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

133p.: il.;30cm.

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

Orientadora: Martelli, Lúcia R.

1.Aberração cromossômica; 2.Citogenômica; 3. Cariótipo; 4. Citogenética;
5. Array-CGH.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Alexandra Galvão Gomes

Título: Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas

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

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli

Aprovada em: ____|____|____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus.

À minha família.

Aos meus amigos.

Ao Leandro e aos seus pais, Neide e Daniel.

A todos aqueles que torceram por mim e tornaram este trabalho possível.

Aos Pacientes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que torceram pelo meu sucesso. Gostaria de agradecer ainda mais aos que trabalharam junto comigo para que este trabalho se tornasse possível.

A **Deus**, esta força espiritual que nos dá sustentação pela fé, em que recorremos nos momentos difíceis e pedimos auxílio, hoje agradeço.

À **Dra. Lúcia Regina Martelli**, por ter me recebido em seu laboratório para estágio, e pelo crédito depositado em mim para prestar a seleção do mestrado pela Genética, sob sua orientação. Obrigada pela confiança e paciência com esta orientada ‘maluquinha’, em um projeto tão importante para o meu crescimento profissional e minha formação acadêmica.

Ao **Silvio Avelino dos Santos**, o biologista mais responsável que conheço, e mais apaixonado pela citogenética que existe neste mundo. Obrigada por me receber com tanta consideração e dedicação, com cumplicidade fraternal e zelo paternal. Obrigada por cada explicação, cada compartilhamento de conhecimento e cada ‘puxada de orelha’ quando necessário.

Ao **Ciro Silveira**, por ser mais do que um colega de laboratório. Amigo, professor, e muitas vezes irmão mais velho. Obrigada pela disponibilidade em ajudar em tudo que era possível, e pelas explicações sempre na ponta da língua. Ou pelo ‘precisa estudar’ quando não sabia.

À **Flavia Gaona**, ou simplesmente Flavinha, por compartilhar os momentos de aprendizado de novas técnicas junto comigo, ser uma grande companheira de trabalho, e compartilhar os momentos de desespero, seja no começo da realização da técnica, na análise dos dados, ou para finalizar o trabalho na época necessária.

À **Tatiana Mozer**, que de estagiária eficiente passou à mestranda, e é uma grande companheira de trabalho e amiga.

À **Juliana Dourado**, pelo companheirismo no laboratório e pela amizade.

Aos médicos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), principalmente os residentes: **Maria Lucía, Juliana Josahkian, Carlos Magno, Carlos Grangeiro, e Natália Quaresemim**. Um muito obrigada especial à médica geneticista **Clarissa Picanço**, grande amiga e futura companheira de laboratório.

A todos os funcionários do HCFMRP. Gostaria de agradecer especialmente aos técnicos do Laboratório de Citogenética **Lucimar, Rinaldo e Sarah**, por todo o auxílio prestado e pela realização dos cariótipos. Também merecem agradecimento especial a enfermeira **Fátima** e a secretária **Márcia** pela coleta e encaminhamento das amostras.

À técnica **Cristiana Padovan**, do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP, e à **Dra. Juliana Meola**, por toda a ajuda.

Ao **Dr. Rodrigo Panepucci**, por nos abrir as portas do seu laboratório para que pudéssemos realizar os arrays. E um agradecimento todo especial à bióloga **Amélia Araújo**, por nos auxiliar em todos os experimentos de array, nos orientando nos procedimentos, obrigada por suportar essa sua colega 'custosa'.

Ao **Dr. Jeremy Squire** e suas colaboradoras da Queens University (**Julia, Madhuri, Maisa e Jennifer**), pelo seu suporte, seja com reagentes, lâminas, e equipamentos, seja com sua disponibilidade em ajudar em discussões, reuniões ou em momentos esporádicos (nas visitas ao laboratório, via skype ou email). Agradeço também pela confiança em me orientar no Doutorado. Thank you very much for all Dr. Jeremy!

Aos colegas da Pós-graduação, que fizeram disciplinas comigo e compartilharam a experiência do mestrado/doutorado. Um agradecimento especial, aos colegas do bloco C: **Marco, Heverton, Gisele, Anderson, Reginaldo, Rafaella, Drous, Viviane, Mariana, Cris, Mateus, Hélida, Simone, Sarah, Murilo, Gabi, Marli, Paulinha e Profa. Ester**. Queria agradecer pela grande amizade das queridas **Larissa, Karina, e Dona Mara** (Maricota Marota). Um agradecimento especial à **Nathalia Cezar**, por toda sua ajuda.

À **Mariana**, colega de república, pela companhia diária, e ser minha irmãzinha postiça.

Aos meus **amigos**, todos eles, sem distinção. Muito obrigada pelo incentivo e força.

Ao **Leandro** e seus pais, **Dona Neide e Seu Daniel**. Muito obrigada pelo companheirismo, amor, dedicação, incentivo, e por me adotarem na família de vocês.

À **minha família**, com todo o meu coração. Obrigada **mamãe, Lício e Alex** (e depois, às cunhadinhas), pelo apoio! Amo vocês, mais do que tudo no mundo!

Aos **membros da Banca Avaliadora**, um muito obrigado pela atenção destinada ao meu trabalho.

Aos **membros do Departamento de Genética**, em especial às secretárias **Susie e Silvia**, por todo o suporte dado durante o período do mestrado.

À **CNPq** e à **CAPES** pelo suporte financeiro ao projeto e pela bolsa de pesquisa.

Por fim, agradecer **a cada paciente** que forneceu sua amostra e autorizou a realização da pesquisa. Este trabalho foi feito para vocês, com muita dedicação. Obrigada!

RESUMO

Gomes, A.G. **Caracterização citogenômica de aberrações cromossômicas**. 2014. 133p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil.

Aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas estão presentes em 0,6% dos recém nascidos e são responsáveis por características fenotípicas variáveis que incluem anomalias congênitas, atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual e infertilidade. A análise por citogenética clássica constitui a principal ferramenta para o diagnóstico de anormalidades cromossômicas, contudo, sua resolução é limitada, impossibilitando a definição do diagnóstico etiológico, ocasionando um acompanhamento médico inadequado, assim como riscos desconhecidos para a família. A hibridação genômica comparativa por microarranjos (aCGH) é uma técnica que permite a análise de todo o genoma humano, identificando com precisão qualquer região alterada e fornecendo informações sobre o número de cópias de sequências de DNA envolvidas em cada região genômica. O objetivo do projeto foi realizar investigação genômica de pacientes portadores de aberrações cromossômicas, para elucidação diagnóstica e correlação entre cariótipo, fenótipo e genótipo. Foram avaliados dez pacientes com cariótipo anormal, caracterizado por material adicional (4), translocação (1), deleção (1), cromossomo em anel (1), inversão cromossômica (1) e cromossomo marcador (2), sem diagnóstico sindrômico definido. O estudo genômico foi realizado por meio da plataforma 2x400K (Agilent,USA) e os resultados foram analisados pelo software Nexus 7.0. Técnicas de citogenética molecular, como FISH e mBand, foram aplicadas para confirmação dos pontos de quebra cromossômica e para validação dos resultados. A técnica de aCGH mostrou-se eficiente para elucidação diagnóstica, sendo possível estabelecer a correlação entre genótipo e fenótipo em oito pacientes. Os resultados permitiram relacionar o ganho genômico na região 8p23 ao fenótipo específico de dislipidemia em dois pacientes; a caracterização molecular da síndrome de Jacobsen, definindo o fenótipo característico da deleção da região 11q24.2-q25; a correlação entre os achados característicos da síndrome de Pallister-Killian e o ganho da região 12p11.21-p13.31; estabelecer o diagnóstico de trissomia do braço curto do cromossomo 8 por ganho nas regiões

8p12,8p11.22-p11.23,8p22 e 8p23.2-23.3; o refinamento diagnóstico da deleção 13q34 com perda de 127 genes mapeados no intervalo 13q-q34 e estabelecer a correlação fenotípica em um paciente com síndrome do olho do gato por ganho da região 22q11.1. Um paciente portador de inversão em ambos os braços do cromossomo 12 em homozigose apresentou ganho em 15q11.1-q11.2, compatível com fenótipo de deficiência mental, obesidade, déficit de atenção e dismorfias faciais. Os resultados obtidos confirmam a habilidade da investigação citogenômica para definição diagnóstica de pacientes portadores de anormalidades cromossômicas, sendo decisivos para o aconselhamento genético.

Palavras-chave: Aberração cromossômica, Citogenômica, Cariótipo, Citogenética, Array-CGH.

ABSTRACT

Gomes, A.G. **Cytogenomic characterization of chromosomal aberrations.** 2014. 133p. Master's degree in Science, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brazil.

Structural or numerical chromosomal aberrations are detected in 0.6% of newborns and are responsible for variable phenotypic findings which include congenital anomalies, developmental delay, intellectual disability and infertility. Analysis by classical cytogenetics remains the main tool for diagnosis of chromosomal abnormalities, however, its resolution is limited, leading to inadequate medical care as well as unknown risks for the families due to undefined etiologic diagnosis. Microarray based comparative genomic hybridization (aCGH) technique allows the analysis of the whole human genome, identifying precisely any abnormal regions and providing information on the copy number of the DNA sequences involved in each genomic region. The goal of this project was to perform genomic investigation in patients with chromosomal aberrations, to further elucidate their diagnosis and to establish correlation between karyotype, phenotype and genotype. Ten patients with abnormal karyotypes, characterized by additional material (4), translocation (1), deletion (1), ring chromosome (1), chromosomal paracentric inversion (1) and chromosome marker (2) were evaluated, all of them had no syndromic diagnosis. Genomic studies were conducted using the 2x400K platform (Agilent , USA) and the results were analyzed by Nexus 7.0 software. Molecular cytogenetic techniques such as FISH and mBand were applied for confirmation of chromosomal breakpoints and to validate the aCGH results. The aCGH technique was highly efficient for precise diagnosis , and the genotype/phenotype correlation was established in eight patients. Our results made it possible to relate the gain in the region 8p23 to the specific phenotype of dyslipidemia in two patients; to provide molecular characterization of Jacobsen syndrome, defining the characteristic phenotype of deletion of region 11q24.2 - q25; to relate characterization of Pallister- Killian syndrome related to the gain in the region 12p11.21 - p13.31 ; to diagnose trisomy of the short arm of chromosome 8 by gains in 8p12, 8p11.22 - p11.23, 8p22 and 8p23.2 - 23.3 regions ; to improve the molecular characterization of 13q34 deletion with loss of 127 genes mapped to 13q31.2 - q34 and to provide a phenotype correlation in one patient with cat eye syndrome, characterized by

the gain of 22q11.1 region. One patient with homozygous 12p12q chromosomal inversion showed 15q11.1 - q11.2 gain, consistent with his phenotype of mental retardation, attention deficit, obesity and facial dysmorphisms. Our results have confirmed the ability of cytogenomic studies to provide and improve diagnostic rates in patients with chromosomal abnormalities and in each case the findings were decisive for genetic counseling.

Keywords: Chromosomal abnormalities, Cytogenomics, Karyotype, Cytogenetics, Array-CGH.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cariótipo humano normal segundo o padrão de Bandas G, de acordo com o ISCN, mostrando os 22 pares cromossômicos autossômicos e os dois pares sexuais possíveis (XY ou XX, sucessivamente) (Wikipremed., 2014).....25
- Figura 2** – Princípios da FISH. (A) Os elementos básicos são as sondas de DNA e a sequência cromossômica alvo. (B) Antes da hibridação, a sonda de DNA é marcada indiretamente com um hapteno (à esquerda), ou diretamente marcado pela incorporação do fluoróforo (à direita). (C) A sonda marcada e o DNA alvo são denaturados para a abertura da cadeia de DNA, tornando-a 2 fitas separadas de cadeia-única. (D) Os elementos são combinados, o que possibilita o anelamento por complementariedade das sequências de DNA. (E) Quando a sonda é marcada indiretamente um passo extra é necessário para visualização do hapteno não-fluorescente, que usa um sistema de detecção enzimático ou imunológico. Finalmente, os sinais são captados por microscopia de fluorescência (Bishop, 2010).....28
- Figura 3** - aCGH de duas cores. DNAs de indivíduos da mesma espécie são diferentemente marcados com fluoróforos compatíveis (Cy3 e Cy5). Quantidades iguais de DNA marcado são hibridados com o chip do microarranjo. As sondas irão hibridar em quantidades iguais nas duas amostras (cor amarela no chip) , refletindo o fato de que a maioria dos loci nos dois genomas estão presentes em quantidades iguais (região 3). Regiões que são deletados do genoma da amostra (região 1) resultaram em sondas com sinal Cy3 relativamente aumentado (cor verde no chip). As proporções do sinal de cor de cada ponto do chip seguem uma distribuição normal de Gauss, e as variações no número de cópias da amostra teste são identificadas

com base no desvio de uma proporção determinadas sondas, utilizando estatística de pontos de corte (Gresham, Dunham e Botstein, 2008).....30

Figura 4 - Tipos de alterações genômicas estruturais que afetam segmentos de DNA, levando a deleções, duplicações, inversões e alterações de CNVS (Bialélicos, Multialélicos e complexos). O único segmento constante é "A." O segmento "B" varia em orientação na inversão. Segmentos "C" e "D" apresentam diferentes tipos de variação (Estivill, 2007).....33

Figura 5 - Comparação de perdas e ganhos nos genomas do Paciente 1 e dos seus genitores. A parte superior do gráfico mostra as porcentagens de alterações na família e, na parte inferior, as alterações individuais.....57

Figura 6 - mBand demonstrando, na parte superior, o esperado para um cromossomo 12 normal. A parte inferior evidencia as inversões em 12p e 12q em dois cromossomos 12 de duas células diferentes do paciente 1. Kit de sondas de mBand utilizadas para o cromossomo 12 (24XCyte, Metasystems, EU).....58

Figura 7 - Comparação de perdas e ganhos nos genomas dos Pacientes 4, 5 e 6 (pai). A parte superior do gráfico mostra as porcentagens de alterações na família e, na parte inferior, as alterações individuais.....67

Figura 8 - Resultado da técnica de FISH do Paciente 5, utilizando a sonda WCPchr8 (Cytocell LPP08R), marcando o cromossomo 8 em vermelho, evidenciando a presença da translocação.68

Figura 9 - Resultado da técnica de FISH do Paciente 6, utilizando a sonda WCPchr8 (Cytocell LPP08R), marcando o cromossomo 8 em vermelho, evidenciando a presença da translocação.68

Figura 10 - Resultado da técnica de FISH utilizando as sondas verde LPT11q-Green (11qtel38- G) e vermelha LPT11p-Red (11ptel03- Red), evidenciando a perda da região terminal apenas do braço longo do cromossomo 11 em anel,

pois este não possui sinal da sonda verde (11qtel), mas possui sinal da sonda vermelha (11ptel).71

Figura 11 - Resultado da técnica de FISH utilizando as sondas G100333-Vermelha (11q25) e G100071-Verde (11qtel) evidenciando a ausência da região 11q21.2-q25 no cromossomo 11 em anel e presença de apenas um sinal verde e um vermelho no cromossomo 11 normal.....71

Figura 12 - mBand do paciente 11, mostrando um rearranjo complexo correspondendo à translocação 1q;11p. **b1)** Cromossomo 1 que, através das curvas das sondas detectadas para o cromossomo 1, revela a ausência da região 1q31.1 → q44. **b2)** Cromossomo 11, de ponta-cabeça, marcado com sonda para o cromossomo 1, revelando presença de parte do cromossomo 1 na região 11p13 → p15.5. **b3)** Cromossomo 1, de ponta-cabeça, marcado com sondas para o cromossomo 11, mostrando a presença de parte do cromossomo 11 na região 1q31.1 → q44. **b4)** Cromossomo 11, marcado com sondas para o cromossomo 11, mostrando a ausência da região 11p13 → p15.5. Kit de sondas mBand para os cromossomos 1 e 11 (24XCyte, Metasystems, EU).....78

Figura 13 – Resultado da técnica de FISH do paciente 13, utilizando a sonda G100550-85501 verde, evidenciando a trissomia da região chr22q11.1-11.21, pela presença de três sinais verdes.82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição dos 13 pacientes investigados, referentes a 9 famílias de pacientes portadores de cariótipo anormal.....43
- Tabela 2** - Descrição das alterações encontradas no paciente 1, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0..... 52
- Tabela 3** - Descrição das alterações encontradas na paciente 2, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.....54
- Tabela 4** - Descrição das alterações encontradas no paciente 3, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.....55
- Tabela 5** - Descrição das alterações encontradas na paciente 4, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0..... 61

Tabela 6 - Descrição das alterações encontradas no paciente 5, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	63
Tabela 7 - Descrição das alterações encontradas no paciente 6, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	65
Tabela 8 - Descrição das alterações encontradas no paciente 7, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	70
Tabela 9 - Descrição das alterações encontradas no paciente 8, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	73
Tabela 10 - Descrição das alterações encontradas na paciente 9, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	74

Tabela 11 - Descrição das alterações encontradas no paciente 10, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	76
Tabela 12 - Descrição das alterações encontradas no paciente 11, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	77
Tabela 13 - Descrição das alterações encontradas no paciente 3, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	79
Tabela 14 - Descrição das alterações encontradas no paciente 13, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo <i>software</i> Nexus 7.0.....	81

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO.....	18
1.1- ANOMALIAS CONGÊNITAS.....	19
1.2 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	20
1.3- INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA.....	24
1.3.1- Citogenética Clássica.....	24
1.3.2- Citogenética Molecular.....	27
1.3.3 – Citogenômica.....	29
1.4 – CORRELAÇÃO CARIÓTIPO/FENÓTIPO/GENÓTIPO.....	31
1.4.1 - Variação do Número de Cópias de Segmentos de DNA (CNVs).....	32
2.0 – JUSTIFICATIVA.....	36
3.0 – OBJETIVOS.....	39
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4.0 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 – CASUÍSTICA.....	42
4.2 – MATERIAIS.....	43
4.3 – MÉTODOS.....	44
5.0 – RESULTADOS.....	50
6.0 – DISCUSSÃO.....	83
7.0 – CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXOS.....	115

Introdução

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 – Anomalias Congênicas

Anomalia congênita (AC) pode ser definida, de forma simplificada, como qualquer alteração presente ao nascimento. Esta definição pode ser ampliada a todas as anomalias funcionais ou estruturais do desenvolvimento do feto, originada antes do nascimento, seja por fator genético, ambiental ou desconhecido, mesmo quando o defeito não for aparente no recém-nascido e só manifestar-se mais tarde. Essas alterações podem resultar em danos físicos e/ou mentais (Horovitz *et al.*, 2005).

Segundo Jones (2007), o processo básico de morfogênese é geneticamente controlado, mas pode ser alterado por fatores ambientais. A maioria das síndromes e malformações é determinada geneticamente, e as alterações genéticas podem afetar a dosagem gênica (anomalias cromossômicas), afetar o próprio gene (doenças monogênicas), ou levar à susceptibilidade a erros durante o desenvolvimento, por alteração ambiental (herança multifatorial).

A herança mendeliana é a de maior incidência. Os agentes teratogênicos também podem ser responsáveis por anomalias congênicas, principalmente as endocrinopatias maternas e a ingestão de agentes químicos pela mãe. Alguns agentes infecciosos também são notadamente deletérios à organogênese fetal, como os vírus da rubéola, da imunodeficiência humana (HIV) e do citomegalovírus (CMV). Contudo, cerca de 70% das ACs permanecem com etiologia desconhecida (Calone *et al.*, 2009).

Além disso, outros fatores são considerados de risco, como as idades paterna e/ou materna avançadas, a consanguinidade entre os pais, e determinadas deficiências nutricionais da mãe (Luquetti e Koifman, 2011).

Considera-se que cerca de 5% dos nativos apresentam alguma anomalia do desenvolvimento, determinada total ou parcialmente por fatores genéticos. O papel relativo do componente genético pode ser maior ou menor, dependendo de sua interação com o ambiente (Horovitz *et al.*, 2005; Horovitz *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011).

Embora raras quando individualmente contabilizadas, em conjunto, as ACs são responsáveis por uma proporção significativa de mortalidade em lactentes e crianças, particularmente, em áreas onde a mortalidade infantil devido a causas comuns tem sido reduzida. As crianças afetadas apresentar risco de morte quatro vezes maior durante o

primeiro ano de vida. Outra consequência é o risco de complicações clínicas mais graves e maior número de hospitalizações (Luquetti e Koifman, 2011).

Anomalias congênitas são consideradas a principal causa de mortalidade infantil nos países desenvolvidos. Uma tendência semelhante tem sido observada nos países em desenvolvimento. No Brasil, saltou da quinta para a segunda causa de morte de crianças menores de um ano de idade, entre 1980 e 2000 (Calone *et al.*, 2009).

À medida que as doenças de origem infectocontagiosa e carencial estão sendo diagnosticadas e tratadas, aquelas de ordem congênita e hereditária tornam-se relevantes para a saúde pública, exigindo ações oficiais específicas (Horovitz *et al.*, 2006). Além da alta morbi-mortalidade, outra problemática refere-se à cronicidade. O paciente com doença crônica necessita de tratamento contínuo, implicando em altos custos. A estimativa de custo-vida médio por criança com anomalias congênitas deve incluir, além do tratamento médico, procedimentos paramédicos para estimulação do desenvolvimento (como fisioterapia, fonoaudiologia, terapia ocupacional), educação especial ou inclusiva, perda da produtividade por incapacidade e perda na arrecadação salarial familiar do responsável (Horovitz *et al.*, 2005).

Informações sobre ACs são consideradas importantes a fim de instituir medidas preventivas na sociedade. Diagnósticos precisos são considerados pré-requisito para o prognóstico e planejamento da conduta para cada paciente, bem como para o aconselhamento genético da família (Oliveira *et al.*, 2011).

1.2 – Aberrações Cromossômicas

Aberrações cromossômicas representam a visualização, ao microscópio, de um amplo espectro de alterações do DNA dos cromossomos, geradas por diferentes mecanismos (Obe *et al.*, 2002). A formação dessas alterações pode ser induzida por meio de processos endógenos associados ao metabolismo oxidativo, erros durante a replicação do DNA e de várias formas de recombinação de regiões específicas de DNA, mas também podem ser provocadas por agentes exógenos, tais como a radiação ionizante e produtos químicos. A alteração da integridade do genoma, capaz de provocar lesões graves ao DNA, se não reparada ou reparada incorretamente, pode causar instabilidade genômica, câncer, mutações e/ou morte celular (Thompson., 2008).

Os primeiros estudos descrevendo aberrações cromossômicas foram publicados por Perthes, em 1904, sobre oócitos irradiados de *Ascaris megalocephala*, e por Koernicke, sobre irradiação de células de pontas de raiz de *Vicia faba* and *Pisum sativum* (Natarajan *et al.*, 2008).

Uma célula humana normal possui 46 cromossomos e cada um deles possui certo número de genes. A estabilidade no número e na estrutura dos cromossomos é fundamental para que o desenvolvimento ocorra de maneira correta. As alterações cromossômicas são classificadas em dois grandes grupos: as numéricas (aneuploidias e poliploidias), mais comuns; e as estruturais, que afetam apenas a configuração do cromossomo. Como os genes estão dispostos nos cromossomos, qualquer modificação em sua estrutura ou número pode alterar a expressão gênica, gerando um indivíduo fenotipicamente inviável ou anormal. Uma alteração no número de cromossomos pode acarretar consequências graves ao fenótipo do portador, pelo aumento ou diminuição do número de cópias dos genes presentes no cromossomo envolvido (Maluf, 2011).

Aproximadamente 0,6% dos recém-nascidos e mais de 50% dos abortos espontâneos apresentam aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas (Natarajan e Boei, 2003).

Inversões, inserções, translocações recíprocas e robertsonianas são exemplos de alterações estruturais equilibradas. Neste tipo de rearranjo o conjunto cromossômico está completo, e o fenótipo geralmente é normal, já que não há perda ou ganho de material genético, apesar da configuração cromossômica diferente. Porém seus portadores podem produzir gametas anômalos com aberrações não equilibradas, gerando conceptos portadores de aberrações cromossômicas não equilibradas. Nos rearranjos não equilibrados, o conjunto cromossômico contém material cromossômico adicional ou ausente, resultando, geralmente, em alterações fenotípicas. Deleções, duplicações, cromossomos em anel, isocromossomos e cromossomos dicêntricos são exemplos de alterações estruturais não equilibradas. (Thompson, 2008).

Os pontos de quebra cromossômica ocorrem preferencialmente na eucromatina. Regiões teloméricas e subteloméricas também desempenham um papel importante na formação de alterações, pois são pontos frequentes de trocas simétricas entre cromátides homólogas e de aberrações crípticas, sendo essas regiões comumente associadas às anomalias congênitas (Obe *et al.*, 2002).

Deleções e duplicações de sequências de DNA podem abranger de centenas a centenas de milhares de bases. De maneira geral, sabe-se que a perda de material codificante é mais grave que o ganho deste material (Maluf, 2011).

Deleções envolvem a perda de sequências de DNA, e seus efeitos fenotípicos dependem do tamanho e localização das sequências perdidas. Por exemplo, deleções que se estendem ao centrômero resultam em um cromossomo acêntrico, que provavelmente será perdido durante a divisão celular. As deleções podem causar efeitos de dosagem gênica, assim como as duplicações, gerando fenótipo. Quanto maior a deleção, mais genes estarão envolvidos, e mais drástico o fenótipo resultante (Clancy e Shaw, 2008).

Gardner e Colaboradores (2012) afirmam que os rearranjos balanceados são comuns, inclusive em membros de uma mesma família, e ocorrem geralmente entre os cromossomos autossômicos. Um portador de uma translocação balanceada possui um risco maior de gerar descendentes com alterações físicas e mentais, se transmitir o cromossomo com segmento aneuplóide.

Translocações aparentemente equilibradas aparecem com uma frequência de 0.3% na população em geral. Estudos mostraram que casais com histórico de vários abortos espontâneos possuem frequência de 9,02% para o mesmo tipo de alteração, o que evidencia uma prevalência muito maior do que no resto da população. Enquanto translocações cromossômicas (equilibradas e desequilibradas) são observadas em 0,2% dos recém-nascidos, esse percentual sobe para 2,5% em casais sem sucesso em tentativas para engravidar. Apesar deste tipo de alteração frequentemente gerar fenótipo normal, ela tem um grande significado em relação à produção de gametas com alterações cromossômicas não equilibradas e progênie anormal (Uysal *et al.*, 2013).

No laboratório de Citogenética Humana Molecular da FMRP-USP, foi realizado um estudo citogenético com 120 casais com abortamentos de repetição, que detectou 9,1% da amostra com polimorfismos cromossômicos localizados no cromossomo 9 (Pereira-Martins, 2000).

Alterações genômicas equilibradas que causam variações estruturais no DNA podem contribuir significativamente para a instabilidade do genoma (Stankiewicz e Lupski, 2010).

As translocações podem ser herdadas (familiais) ou esporádicas (*de novo*), essa última caracterizada por genitores com cariótipo normal. Anomalias cromossômicas equilibradas não parecem afetar o fenótipo do portador, mas podem levar a alterações na fertilidade, afetando sua habilidade de reprodução por produção de gametas desequilibrados, o

que pode levar à infertilidade, abortos, ou à produção de descendentes com malformações e/ou deficiência intelectual (Al-Ashi e Sharif, 2013).

O aperfeiçoamento das técnicas de bandamento cromossômico permitiu o diagnóstico de alterações citogenéticas cromossômicas sutis. Contudo, algumas translocações aparentemente equilibradas possuem microdeleções ou microduplicações não visualizados via cariotipagem, mas que afetam vários genes, levando a alterações no fenótipo. Com isso, pode-se utilizar de citogenética molecular e citogenômica para refinar o diagnóstico (Silva *et al.*, 2007).

Cerca de 10-15% de todas as gestações clinicamente reconhecidas acabam em aborto, a maioria das quais ocorre no primeiro trimestre. Destes abortos de primeiro trimestre, aproximadamente 50% são causados por anormalidades cromossômicas. A maioria destas (86%) são alterações numéricas, incluindo trissomias, monossomias e poliploidias (triploidia ou tetraploidia). Anormalidades cromossômicas estruturais (grandes duplicações ou deleções, visíveis por cariótipo convencional) são responsáveis por mais de 6%, e outras anomalias, tais como mutações de um único gene e mosaicismo, somam 8% (Gao *et al.*, 2012).

Para pacientes portadores de translocações, a análise cromossômica dos pais e de parentes de primeiro grau pode determinar se a translocação é *de novo* ou familiar. Em 1967, as alterações cromossômicas familiares foram propostas pela primeira vez como uma das causas de aborto espontâneo recorrente. Nos anos seguintes vários estudos sobre casais com história de dois ou mais abortos espontâneos encontraram taxas de irregularidade cromossômicas entre 2 e 17,75%. Apesar das diferentes taxas de irregularidade cromossômica encontradas nestes estudos, as translocações equilibradas e as translocações Robertsonianas foram as mais encontradas, seguidas por outras irregularidades, como inversões e mosaicismo cromossômico. Acredita-se que os casais com abortos espontâneos recorrentes, juntamente com os casais inférteis, devem ser aconselhados a fazer exames citogenéticos. Devido ao risco de produzirem um feto com anomalias congênitas. As gestações de portadores de translocação equilibrada, que não terminam em aborto espontâneo, são indicadas para a amniocentese e análise cromossômica (Uysal *et al.*, 2013).

A detecção de anormalidades cromossômicas fornece as informações necessárias para o aconselhamento genético: o risco de ter recorrentes abortos, de ter filhos com anomalias congênitas, e a discussão das várias opções reprodutivas disponíveis para os casais. Têm-se observado em casais portadores de translocações, submetidos às técnicas de reprodução assistida, que homens com 65% de espermatozoides anormais têm boa chance de gerar uma criança fenotipicamente normal (Silva *et al.*, 2007). O diagnóstico genético pré-

implantacional (PGD), utilizando técnicas moleculares versáteis (FISH, aCGH e STRs baseados em PCR), está se tornando um procedimento de rotina e uma opção viável para os casais com anormalidades cromossômicas que querem ter uma prole saudável via reprodução assistida (Al-Ashi e Sharif, 2013).

Os exames de citogenética clássica, molecular e citogenômica são, portanto, esclarecedores para uma parcela significativa de casais em que é identificada uma anomalia cromossômica. Estas informações são importantes para o geneticista estabelecer o risco de outras perdas gestacionais ou malformações fetais nas gerações futuras, estabelecer o diagnóstico de infertilidade, ou, no caso de casais com cariótipo normal, direcionar as investigações para outras causas genéticas ou não genéticas (Goel e Phadke, 2011; Dhillon *et al.*, 2014).

1.3 - Investigação Citogenética

1.3.1- Citogenética Clássica

O método padrão de investigação citogenética é a análise de cromossomos por padrão de bandas, resultado da alternância de faixas claras (ricas em bases GC) e escuras (ricas em bases AT), em que cada cromossomo tem uma configuração diferente e padronizada (figura 1). Sua finalidade é distinguir entre um cariótipo normal e um anormal, identificando e descrevendo a alteração ocorrida. Aberrações cromossômicas numéricas e translocações simples são definidas de forma confiável por citogenética clássica. Além disso, os métodos de citogenética molecular, como FISH ou SKY, e técnicas de citogenômica podem ser aplicados para confirmar o diagnóstico (Chudoba *et al.*, 2004).

Antes da descoberta das técnicas de bandamento, os cromossomos eram apenas agrupados e classificados de acordo com seu tamanho, forma, posição do centrômero e morfologia cromossômica bruta. Os primeiros estudos citogenéticos mostraram que uma cópia extra ou falta de determinados cromossomos humanos eram associadas a doenças. A associação mais conhecida era a cópia extra do cromossomo 21 com a síndrome de Down. Ao mesmo tempo, outras doenças com anomalias numéricas foram detectadas, como a síndrome de Turner (45, X), síndrome de Klinefelter (47, XXY), síndrome de Patau (trissomia 13), etc. O desenvolvimento da técnica de bandas Q, em 1970, possibilitou melhor visualização do genoma e levou à estratificação das regiões genéticas com base na intensidade das bandas,

que mais tarde foram chamadas de eucromatina e heterocromatina. Várias outras técnicas de bandas foram desenvolvidas posteriormente, como as bandas G, R, C e NOR. Para diagnóstico citogenético, a técnica de Bandas G, que é realizada através da coloração dos cromossomos com solução de Giemsa, tornou-se o método mais utilizado. Durante as últimas seis décadas, a citogenética evoluiu de uma ferramenta de pesquisa para um conjunto de técnicas utilizadas para rotina diagnóstica. Sua capacidade de visualizar o genoma de um indivíduo em um único teste lhe deu grande importância no diagnóstico de doenças genéticas e tratamento clínico. As várias técnicas de bandamento fizeram da citogenética uma ferramenta indispensável para o diagnóstico de várias doenças genéticas, especialmente atraso no desenvolvimento neuropsicomotor sem etiologia definida, diferenciação sexual anormal, infertilidade, abortos recorrentes, gestação com risco de aneuploidia, síndromes cromossômicas e câncer (Sheth *et al.*, 2014).

Figura 1 - Cariótipo humano normal segundo o padrão de Bandas G, de acordo com o ISCN, mostrando os 22 pares cromossômicos autossômicos e os dois pares sexuais possíveis (XY ou XX, sucessivamente) (Wikipremed., 2014).

Desde 1960, a análise por citogenética tem sido o principal meio de diagnóstico de anormalidades cromossômicas. Contudo, apesar do aperfeiçoamento da técnica e das melhorias na resolução, o cariótipo só pode detectar anomalias entre 5-10 Mb (Hillman *et al.*, 2011).

Em 1977, em Estocolmo - Suécia, houve um encontro entre o comitê de especialistas em citogenética, que decidiram unificar as várias descobertas descritas em outras conferências científicas, criando um documento intitulado “An International System for Human Cytogenetic Nomenclature”, abreviado como ISCN (1978), incluindo todas as maiores decisões das conferências dos anos anteriores, ocorridas nas cidades de Denver, Londres, Chicago e Paris. Foi providenciado um único documento com um sistema completo de nomenclatura em citogenética humana. Este documento foi atualizado ao longo dos anos, e até hoje é usado como referência entre profissionais da área. Hoje, o ISCN conta com padrão de nomenclatura não apenas para citogenética clássica, mas também para citogenética molecular e citogenômica (Shaffer *et al.*, 2013).

O ISCN, para citogenética clássica, funciona como um sistema de identificação das bandas cromossômicas, que começa com o centrômero como referência. Os cromossomos são divididos em um braço longo e um braço curto, com base na posição do centrômero. O braço mais curto do cromossomo é nomeado “p”, de *petite*, palavra francesa para “pequeno”. O braço mais longo é nomeado “q”, ou *queue*, palavra francesa que significa “cauda”. Assim, regiões cromossômicas que estão presentes no braço curto começarão com a designação p, enquanto que as regiões no braço longo vão começar com q. Por convenção, no cariótipo, o braço p do cromossomo é sempre mostrado virado para cima. Cada braço do cromossomo é então dividido em regiões, e os números atribuídos para cada região seguem uma ordem crescente, do centrômero ao telômero. Dependendo da resolução do processo de coloração, pode ser possível a detecção de bandas adicionais no interior de cada região, que são designados através da adição de outro dígito para identificar a sub-região (O'connor, 2008).

Atualmente, o cariótipo ainda é o exame inicial mais utilizado no diagnóstico genético de rotina. Se um cariótipo normal inesperado é observado, outros testes podem ser utilizados para elucidar o caso, incluindo técnicas de citogenética molecular, genética molecular, ou citogenômica (Weise *et al.*, 2012).

1.3.2- Citogenética Molecular

Em meados dos anos 80, surgiram as técnicas baseadas em citogenética molecular, devido às limitações inerentes das técnicas de citogenética clássica, tais como a baixa resolução entre 5 a 10 Mb. Em 1986, desenvolveu-se um método para visualização de segmentos específicos dos cromossomos usando marcações por fluorescência, com utilização de sondas. Essa técnica foi chamada de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). Adicionada às técnicas para diagnóstico citogenético, seu uso na rotina laboratorial e na análise de núcleos interfásicos superou as desvantagens da citogenética convencional permitindo uma maior resolução (50 Kb) quando comparada à técnica de bandamento GTG. Atualmente existem técnicas ainda mais avançadas de citogenética molecular, utilizadas principalmente para detecção de deleções submicroscópicas e caracterização de aberrações cromossômicas complexas, como as técnicas de cariótipo espectral (SKY) e de FISH Multicor (M-FISH) (Sheth *et al.*, 2014).

A FISH tornou possível a detecção de sequências específicas de DNA em análise de cromossomos, células e tecidos morfológicamente preservados. Essa tecnologia é baseada na formação duplex, sob condições bem definidas, de um fragmento de ácido nucléico de fita simples modificado (sonda) e sua sequência complementar (sequência alvo) em um material biológico fixado. A técnica de FISH envolve a preparação de sondas específicas de DNA, marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados que são diretamente fluorescentes (método direto) ou podem ser detectados pela ligação a uma molécula fluorescente (método indireto). Tais sondas de cadeias simples de DNA são hibridadas com os cromossomos metafásicos ou interfásicos, como nas técnicas habituais de citogenética. Após a hibridação *in situ*, as lâminas podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência, e as alterações cromossômicas, se presentes, identificadas (figura 2). Atualmente há sondas comerciais para todos os cromossomos. Entre as sondas utilizadas, existem vários tipos: centroméricas ou alfa-satélites; de sequência única; para o cromossomo inteiro; subteloméricas; e teloméricas (Bishop, 2010).

A técnica levou a descobertas de complexidades inesperadas em aberrações cromossômicas, melhorando a compreensão sobre os mecanismos de formação das mesmas (Natarajan e Boei, 2003).

Figura 2 – Princípios da FISH. (A) Os elementos básicos são as sondas de DNA e a sequência cromossômica alvo. (B) Antes da hibridação, a sonda de DNA é marcada indiretamente com um hapteno (à esquerda), ou diretamente marcado pela incorporação do fluoróforo (à direita). (C) A sonda marcada e o DNA alvo são denaturados para a abertura da cadeia de DNA, tornando-a 2 fitas separadas de cadeia-única. (D) Os elementos são combinados, o que possibilita o anelamento por complementariedade das sequências de DNA. (E) Quando a sonda é marcada indiretamente um passo extra é necessário para visualização do hapteno não-fluorescente, que usa um sistema de detecção enzimático ou imunológico. Finalmente, os sinais são captados por microscopia de fluorescência (Bishop, 2010).

Uma técnica de hibridação *in situ* bastante utilizada é o Bandamento Multicor (mBand), que permite uma visualização mais detalhada do padrão de bandas cromossômicas. O princípio da técnica baseia-se na utilização de bibliotecas de sondas microdissecadas diferentemente marcadas e sobrepostas. As razões de intensidade de fluorescência mudam ao longo de cada cromossomo, e são usadas para atribuir diferentes pseudocores para regiões cromossômicas específicas. As imagens são processadas utilizando-se de software especializado (MetaSystems - Isis), que faz a converção do perfil de fluorescência em bandas coradas, que são comparadas com o ideograma padrão (Chudoba et al., 1999; Liehr et al., 2002).

Utilizado principalmente para caracterizar rearranjos intracromossômicos (inversões, deleções, duplicações e inserções), o mBand pode ser empregado para detecção de rearranjos cromossômicos equilibrados ou não, auxiliando na caracterização de rearranjos cromossômicos complexos e cromossomos marcadores, sobretudo quando técnicas de citogenética clássica, molecular ou citogenômica possuem limitações para este tipo de análise (Hu et al., 2006; Seller et al., 2006; Shaffer et al., 2013).

1.3.3 – Citogenômica

A hibridação genômica comparativa por microarranjos (aCGH) é uma técnica molecular nova e robusta que permite a análise do número de cópias de DNA de todo o genoma humano, identificando com precisão a posição cromossômica e a quantidade de cópias das sequências de DNA da região alterada, fazendo uma interligação entre as avaliações citogenética e genômica. Sua alta resolução com extensa cobertura do genoma levou essa tecnologia a ser considerada, em alguns países, o teste genético de primeira linha para indivíduos portadores de anomalias congênitas, deficiência intelectual, distúrbios neuropsicomotores e deficiência no desenvolvimento (Gao *et al.*, 2012).

A triagem de todo o genoma por meio da técnica de aCGH é exclusiva para a detecção de perdas ou ganhos de material genético. Constantemente ela tem sido utilizada para estudar as causas genéticas de morbidade pós-natal, como dismorfias, malformações, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, autismo, epilepsia e esquizofrenia (Iourov *et al.*, 2012).

A técnica de hibridação genômica comparativa (CGH) foi introduzida no início de 1990, para detectar a amplificação de DNA em tumores e, em citogenética, para comparar o DNA do paciente ao do controle, por meio de hibridação em lâminas contendo metáfases normais. No entanto, a metodologia padrão para CGH é muito trabalhosa e exige a utilização de cromossomos metafásicos, o que leva a uma resolução limitada (3-5 Mb). Os recentes avanços na tecnologia, com a utilização de aCGH, tornaram possível substituir a marcação de cromossomos em uma lâmina de vidro, por milhares de pequenos segmentos de DNA sintetizados artificialmente. Os chips de aCGH estão disponíveis comercialmente com uma densidades de clones a partir de 15.000 a 1 milhão de sondas de oligonucleotídeos. A figura 3 descreve o princípio da técnica. Várias plataformas de aCGH têm sido desenvolvidas para aplicação em diagnóstico e pesquisa. Os microarranjos desvendam a região específica do genoma em que houve a alteração, exportando um painel informativo sobre as microdeleções e microduplicações detectadas. Com as informações extraídas, podem-se analisar casos, inclusive, de anomalias congênitas com cariótipo aparentemente normal (Sheth *et al.*, 2014)

Figura 3 - aCGH de duas cores. DNAs de indivíduos da mesma espécie são diferentemente marcados com fluoróforos compatíveis (Cy3 e Cy5). Quantidades iguais de DNA marcado são hibridados com o chip do microarranjo. As sondas irão hibridar em quantidades iguais nas duas amostras (cor amarela no chip), refletindo o fato de que a maioria dos loci nos dois genomas estão presentes em quantidades iguais (região 3). Regiões que são deletados do genoma da amostra (região 1) resultaram em sondas com sinal Cy3 relativamente aumentado (cor verde no chip). As proporções do sinal de cor de cada ponto do chip seguem uma distribuição normal de Gauss, e as variações no número de cópias da amostra teste são identificadas com base no desvio de uma proporção determinadas sondas, utilizando estatística de pontos de corte (Gresham, Dunham e Botstein, 2008).

Miller e colaboradores (2010), fizeram um estudo de comparação entre os diagnósticos resultantes de aCGH com os de citogenética clássica, levando em consideração as vantagens técnicas, limitações, rendimento diagnóstico para vários tipos de aberrações cromossômicas e problemas de interpretação dos resultados. Excluindo pacientes com síndrome cromossômicas comuns, o aCGH ofereceu rendimento diagnóstico muito mais elevado (15%-20%) em relação ao bandamento GTG, com ~ 3 % de rendimento. Assim, os pesquisadores concluíram que o aCGH deve ser o exame genético de primeira linha de

investigação, principalmente por sua maior sensibilidade na detecção de deleções e duplicações submicroscópicas.

A análise cromossômica convencional detecta anomalias cromossômicas como trissomias 21, 18 e 13, e monossomia X, além de muitos rearranjos estruturais. No entanto, há um pequeno número de gestações em que o cariótipo convencional é reconfortante, mas incertezas persistem sobre a etiologia subjacente da alteração pré-natal encontrada. Estudos foram publicados indicando que a tecnologia de aCGH pode detectar previamente aberrações não diagnosticadas. Estes estudos também têm destaque sobre as limitações desta tecnologia. Não menos importante, a identificação de CNVs desconhecidas podem aumentar a ansiedade dos pais e a dificuldade no aconselhamento genético. As ferramentas citogenômicas estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico pré-natal (Hillman *et al.*, 2011).

Atualmente, o diagnóstico de síndromes cromossômicas deve incluir uma combinação de técnicas de citogenética clássica com métodos de citogenética molecular e citogenômica. Os resultados obtidos pela metodologia de aCGH precisam do suporte da citogenética convencional e molecular. Em alguns casos, é necessária investigação dos pais dos pacientes afetados visando a detecção de rearranjo cromossômico equilibrado para aconselhamento genético adequado. Ou seja, as técnicas convencionais, moleculares e genômicas são complementares e permitem a caracterização completa das anormalidades cromossômicas. O diagnóstico preciso permite estabelecer correlação entre genótipo e fenótipo, fornecer prognósticos e estimar os riscos reprodutivos para o paciente e sua família (Venegas-Vega *et al.*, 2013); Bint, Davies e Ogilvie, 2013).

1.4 – Correlação Cariótipo/Fenótipo/Genótipo

Segundo Gardner (2012), segmentos de DNA de tamanhos diferentes, deletados ou duplicados, revelam a contribuição daquela região para um fenótipo anormal. As várias associações entre cariótipo/fenótipo, ao longo do tempo, permitiu a avaliação do risco de alterações genéticas diferentes para a saúde humana, levando à possibilidade de prever o prognóstico do paciente após elucidação diagnóstica do mesmo. Assim, é possível construir mapas de ligação entre as características fenotípicas dos pacientes, com as alterações genéticas descritas associadas à elas. Atualmente, com a utilização de técnicas de citogenômica foi possível fazer associações ainda mais refinadas, especificando os genes

envolvidos. Com isso, microalterações encontradas no genoma do paciente podem ser associadas ao seu fenótipo, permitindo ao médico estabelecer seu prognóstico e tratamento de forma mais específica.

1.4.1 – Variações no Número de Cópias (CNVs)

A aplicação de ferramentas para análise do genoma humano levou à descoberta de uma ampla variação na estrutura genômica, com tamanho de quilobases (Kb) a megabases (Mb), não identificáveis pelo bandamento cromossômico convencional, que foram denominadas variações no número de cópias (CNVs) (Stankiewicz e Lupski, 2010).

CNV pode ser definida como a variação no número de cópias de sequências de DNA no genoma, que são fonte de diversidade entre indivíduos saudáveis. Essas variações estruturais são geralmente herdadas, e estima-se que elas representem cerca de 12% do genoma humano (Lee Ja, 2007; Clancy e Shaw, 2008).

Deleções, duplicações, triplicações, inserções e translocações podem resultar em CNVs (figura 4).

O fato da variação do número de cópias de DNA ser um fenômeno generalizado e comum entre os seres humanos foi caracterizado, pela primeira vez, após a conclusão do projeto genoma humano. CNVs podem levar a diferentes fenótipos em diferentes grupos étnicos, de gênero, ou mesmo em grupos familiares (Park, C. *et al.*, 2011).

A descoberta das CNVs em nossos genomas mudou radicalmente a perspectiva sobre a variação estrutural do DNA e sua relação com doenças. As CNVs têm importância para a evolução humana, para a diversidade genética entre os indivíduos e para um número cada vez maior de doenças ou suscetibilidade a algumas doenças. Foram descritos diferentes mecanismos baseados em replicação e recombinação que justificam a formação de CNVs (Stankiewicz e Lupski, 2010). O atraso na forquilha e mudança no molde são erros de replicação que foram recentemente propostos como mecanismos causadores de algumas CNVs (Lee Ja, 2007).

Figura 4 - Tipos de alterações genômicas estruturais que afetam segmentos de DNA, levando a deleções, duplicações, inversões e alterações de CNVs (Bialélicos, Multialélicos e complexos). O único segmento constante é "A." O segmento "B" varia em orientação na inversão. Segmentos "C" e "D" apresentam diferentes tipos de variação (Estivill, 2007).

Os efeitos fenotípicos das CNVs são, por vezes, pouco claros e dependem, principalmente, se os genes são sensíveis às alterações de dosagem ou se as sequências regulatórias são afetadas pelo rearranjo genômico. Doenças esporádicas também podem ser o resultado de uma combinação de duas CNVs num único loco (por exemplo, a atrofia muscular espinal autossômica recessiva) ou teoricamente a partir de dois ou mais CNVs em locos diferentes a partir de pais normais. Deleções e duplicações podem causar fenótipos por vários mecanismos moleculares. Além do efeito de dosagem, as CNVs também podem gerar um efeito de posição. Esses efeitos de posição têm sido descritos em translocações aparentemente equilibradas, sendo que ainda são efetivos quando os pontos de interrupção mapeados estão até aproximadamente 1 Mb distante, anterior ou posteriormente, do gene causador. Outro mecanismo molecular pelo qual os rearranjos do genoma podem transmitir ou alterar o fenótipo da doença é a presença de mutações recessivas ou polimorfismos funcionais dos

alelos restantes quando ocorre uma deleção. Além disso, rearranjos genômicos podem potencialmente agir através de efeitos de transvecção (comunicação entre alelos em cromossomos homólogos), pela deleção de alguns elementos regulatórios necessários para a comunicação entre alelos ou simplesmente por interromper uma sequência codificante (Stankiewicz e Lupski, 2010).

A interpretação clínica das variações no número de cópias tem sido problemática por várias razões. Em primeiro lugar, as associações às doenças por muitas CNVs individuais permanecem obscuras devido a sua raridade e a necessidade de triar amostras grandes. Em segundo lugar, mesmo para CNVs claramente patogênicas, os genes sensíveis à dosagem que fundamentam os fenótipos observados, em geral não têm sido identificados porque as CNVs são grandes e abrangem muitos genes. Finalmente, a variação considerável na expressividade é frequentemente observada, contribuindo para a evolução de doenças diferentes. Assim, enquanto o risco da doença em geral é bem estabelecido, as consequências fenotípicas para a maioria das grandes CNVs não estão bem caracterizadas e seus efeitos permanecem desconhecidos (Cooper *et al.*, 2012).

O aCGH tem desempenhado um papel vital na detecção de CNVs maiores do que 1 kb, que ocorrem em pacientes com defeitos cardíacos, doenças neurológicas e psiquiátricas, entre outras (Sheth *et al.*, 2014). Um dos desafios da aplicação da aCGH, no cenário clínico, é determinar se um desequilíbrio no número de cópias é *de novo* e patogênico (provável causador de doenças), ou herdado e benigno. Ao analisar os dados dos microarranjos em um ambiente clínico, citogeneticistas clínicos categorizam as CNVs em aquelas que são provavelmente benignas, aquelas que são provavelmente patogênicas e aquelas de significado clínico desconhecido. CNVs que se sobrepõem a regiões críticas de síndromes de microdeleções ou microduplicações estabelecidas são suscetíveis de serem patogênicas (Hillman *et al.*, 2011).

CNVs extensas têm grande importância entre os casos graves de doenças em crianças, incluindo alterações neurológicas e anomalias congênitas, bem como doenças neuropsiquiátricas (Cooper *et al.*, 2012). Desequilíbrios cromossômicos e CNVs são também considerados as causas genéticas mais comuns de deficiência intelectual e anomalias congênitas (Iourov *et al.*, 2012).

Microdeleções e microduplicações são apenas alguns dos aspectos das variações que ocorrem no genoma humano. Como a maioria dos pacientes com Síndromes de Microdeleções ou Microduplicações (MMS) apresentam deficiência intelectual grave, boa

parte deles não se reproduz, sugerindo que essas doenças sejam mais uma expressão da modificação da estrutura do genoma humano do que doenças hereditárias (Weise *et al.*, 2012).

Algumas regiões específicas com sequências repetitivas são suscetíveis a esses rearranjos genômicos que resultam em CNVs, e podem ser identificadas pelo uso de técnicas de citogenética, como hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), hibridação genômica comparativa por microarranjos (aCGH) e cariotipagem virtual com SNP arrays (Prakash, 2011).

Para estudo científico e clínico, as CNVs têm sido catalogadas em bancos de dados públicos, como o Banco de Dados de Variantes Genômicas de Toronto. As CNVs clinicamente relevantes podem ser encontradas em outros bancos de dados, como o DECIPHER (banco de dados de desequilíbrios cromossômicos e fenótipos em seres humanos utilizando os recursos Ensembl, <http://decipher.sanger.ac.uk>) e o ECARUCA (Associação Europeia de Citogeneticistas para Registro de Aberrações Cromossômicas Desequilibradas, <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>).

Justificativa

2.0 - JUSTIFICATIVA

No Brasil, ocorrem cerca de três milhões de nascimentos ao ano e estima-se que, destes recém-nascidos, ao menos 60 mil sejam portadores de anomalias congênitas. A caracterização dessas anomalias é de grande importância para o aconselhamento genético (Luquetti e Koifman, 2010).

As anomalias congênitas estão diretamente relacionadas às aberrações cromossômicas, que por sua vez são responsáveis por uma proporção significativa de pacientes com malformações congênitas, dismorfias, atraso de desenvolvimento e deficiência intelectual (Al-Ashi e Sharif, 2013).

Sendo assim, anomalias congênitas causadas por alterações genéticas não identificadas frequentemente permanecem sem diagnóstico sindrômico e etiológico definidos, acarretando em acompanhamento médico inadequado, assim como riscos desconhecidos para a irmandade e/ou descendência.

A utilização de técnicas de citogenômica permite detectar alterações com resolução de 10 kb, elevando os índices de diagnóstico, contribuindo para a análise do desenvolvimento e progressão das doenças congênitas e permitindo a caracterização de doenças genômicas.

Considerando que a maioria das anomalias congênitas apresenta etiologia genética, porém desconhecida e/ou não caracterizada, a associação de diferentes metodologias permitirá estabelecer o diagnóstico genômico, na tentativa de estabelecer correlação fenótipo/genótipo dos pacientes.

Desde 1998, o Laboratório de Citogenética do HCFMRP-USP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) utiliza técnicas de citogenética clássica para a definição do cariótipo de pacientes atendidos nos Ambulatórios de Genética Médica do HCFMRP-USP, tendo sido pioneiro no credenciamento pelo SUS. Nesse período, até Julho de 2010, foram realizados mais de 5000 cariótipos, com média de 960 novos exames por ano, encaminhados pelo setor de Genética Médica do mesmo Hospital. Os Ambulatórios de Genética do HCFMRP-USP atendem, em média, 3.500 pacientes por ano. Excluindo os Ambulatórios especializados (Câncer Familiar, Medicina Fetal e Intersexualidade), a porcentagem de pacientes com fenótipo anormal sem diagnóstico sindrômico específico varia entre 40 e 50%, sobrecarregando o Sistema de atendimento à saúde, aumentando o número de consultas e o tempo de seguimento dos pacientes. Sendo

assim, o objetivo principal do processo de Aconselhamento Genético, que é a prevenção primária de doenças genéticas, torna-se prejudicado.

Este projeto de pesquisa propõe a associação de metodologias, incluindo citogenética clássica (cariótipo), citogenética molecular (mBand e FISH) e citogenômica (aCGH), na tentativa de estabelecer o diagnóstico de alterações genômicas, aumentando o índice de diagnóstico, definindo o diagnóstico etiológico e consequentemente direcionando o aconselhamento genético. Além de proporcionar melhor assistência às famílias, poderá colaborar para definição e caracterização de síndromes genômicas, criando novas perspectivas para a pesquisa de genes de desenvolvimento associados a achados fenotípicos.

Objetivos

3.0 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo principal

Detectar alterações genômicas relacionadas ao desenvolvimento de anomalias congênitas em pacientes portadores de aberrações cromossômicas sem diagnóstico sindrômico definido, visando determinar correlação entre genótipo e fenótipo.

3.2 - Objetivos secundários

- Detectar desequilíbrios genômicos em pacientes portadores de anomalias congênitas e cariótipo anormal;
- Definir regiões e genes candidatos relacionados ao desenvolvimento de determinadas anomalias congênitas;
- Estabelecer o diagnóstico citogenético preciso em pacientes com cariótipo anormal;
- Estabelecer diagnóstico sindrômico definitivo por meio de correlação entre o fenótipo dos pacientes e seu genótipo;
- Estabelecer o diagnóstico etiológico de pacientes com anomalias congênitas e cariótipo anormal, visando oferecer aconselhamento genético adequado para as famílias.

Material e Métodos

4.0 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Casuística

Foi realizada uma triagem no banco de dados do Laboratório de Citogenética, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, abrangendo pacientes atendidos nos últimos cinco anos pelo setor de Genética Médica do mesmo hospital. Selecionou-se, então, um grupo de pacientes com fenótipos alterados, portadores de anomalias congênitas sindrômicas e rearranjos cromossômicos.

Os responsáveis pelos pacientes assinaram a autorização para coleta de exames e demais procedimentos, conforme Termo de Responsabilidade do Prontuário Médico do Hospital (formulário HC54-3i). Todos os responsáveis pelos pacientes ou pacientes maiores de idade participantes do estudo foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e autorizaram uso das amostras para análise e publicação dos resultados mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao Projeto #207/2007 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

Após exame médico clínico e realização do cariótipo convencional por bandamento GTG, foram selecionados dez indivíduos (pacientes 1; 4; 5; 7; 8; 9; 10; 11; 12 e 13), com anomalias congênitas e cariótipo anormal, para investigação citogenômica e posterior correlação cariótipo/fenótipo/genótipo.

Foram envolvidas nove famílias no estudo, com investigação de treze indivíduos que possuíam cariótipos com aberrações cromossômicas. Sete casos foram investigados isoladamente, e dois casos incluíram investigação de outros membros da família, sendo três indivíduos da família A (o paciente e seus pais) e três da família B (dois pacientes e o pai). A descrição dos casos clínicos investigados encontra-se na Tabela 1.

A avaliação clínica, o histórico familiar com heredograma, assim como o resultado do cariótipo dos pacientes encontram-se descritos no anexo I.

Tabela 1 - Descrição dos 13 pacientes investigados, referentes a 9 famílias de pacientes portadores de cariótipo anormal.

Família	Paciente	Sexo	Idade	Cariótipo
1	1	Masculino	16	46,XY,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2
	2	Feminino	50	46,XX,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2
	3	Masculino	40	46,XY,inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)
2	4	Feminino	11	46,XX,der(4)t(4;8)(p16;p23.1)pat
	5	Masculino	11	46,XY,der(4)t(4;8)(p16;p23.1)pat
	6	Masculino	43	46,XY,t(4;8)(p16;p23.1)
3	7	Masculino	12	45,XY,-11[18]/46,XY,r(11)[78]/46,XY,dicr(11;11)[4]
4	8	Masculino	17	46,XY,add(12)(p13)
5	9	Feminino	25	47,XX,+mar
6	10	Masculino	3	46,XY,del(13)(q31)
7	11	Masculino	10	46,XY,t(1;11)(q31;p13)
8	12	Feminino	7	46, XX, add8p,inv(9)p13q13
9	13	Masculino	3	47,XY,+mar

4.2 – Material

Foram coletados 10ml de sangue periférico de cada indivíduo da amostra, em dois tubos Vacutainer®. Um tubo contendo heparina sódica, para cultura temporária de linfócitos visando a obtenção de metáfases para estudo citogenético molecular, e um segundo tubo contendo EDTA, para extração de DNA e aplicação da técnica de array-CGH.

4.3 - Métodos

4.3.1 – Estudo Citogenético Molecular

4.3.1.1 - Cultura temporária de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960, modificada)

500µL de sangue coletado dos pacientes foram cultivados em 5ml de meio RPMI 1640 (cat n° 11875, GIBCO, Invitrogen) com L-glutamina suplementado com 2% de fitohemaglutinina (cat n° 10576-015, GIBCO, Invitrogen), estreptomicina / penicilina (cat n°15140-148, GIBCO, Invitrogen) e 20% de soro bovino fetal (cat n° 12657-029, GIBCO, Invitrogen) em estufa a 37°C, por 72 horas. Meia hora antes de completar o tempo de cultura, foram adicionados ao meio 250µL de colchicina a 0,0016% (cat n° C3915-1G, Sigma), retornando assim à estufa pelo tempo restante, etapa em que as células são bloqueadas na fase de metáfase da divisão celular. Após meia hora, foi realizada a 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 a 37°C. No tubo foram adicionadas 10 gotas de solução Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) para interromper a ação da hipotônica e, após homogeneização, foi realizada nova centrifugação por 10 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante foi retirado e o material fixado pela adição de 5mL de solução Carnoy. O material foi homogeneizado e mantido por 10 minutos em repouso em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido. Esta etapa de lavagem pela adição de solução Carnoy foi repetida mais duas vezes, agora sem o tempo de repouso, e a suspensão celular resultante foi utilizada para a confecção de lâminas.

4.3.1.2 – Técnica de Hibridação in situ por Fluorescência (FISH)

Para a realização da técnica, foram utilizadas as seguintes Sondas *Cytocell* (Cambridge, UK): 11qtel38 Green (LPT11q-Green); 11ptel03 Red(LPT11p-Red); WCPchr8 (Cytocell LPP08R). Também foram utilizadas as sondas *SureFISH* Agilent (CA, EU) G100333-Red 11q25 (região:133935398-134140426); G100071-Green 11qtel (região: 134649534-134945261); G100550-Green chr22α-satélite (região:17427487-18040145).

A técnica foi aplicada de acordo com protocolo do fornecedor, com pequenas modificações. As lâminas, contendo uma ou duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas em repouso por três dias para envelhecimento. Foram então lavadas em solução 2xSSC em temperatura ambiente por dois minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol 70%, 90% e 100%, em temperatura ambiente, por dois minutos cada, e deixadas para secar. Após a secagem das lâminas, foram aplicados 10µl de sonda, previamente denaturada em banho-maria a 37°C por 10 minutos, em cada lâmina pré-aquecida a 42°C, coberta por lamínula e selada com *rubber cement* (Elmer's, USA). A hibridação ocorreu em *ThermoBrite* (Abbot Molecular, USA) mantendo temperatura inicial de 75°C por dois minutos e, então, reduzida para 37°, sendo o programa manualmente interrompido após aproximadamente 14 a 16 horas.

Após hibridação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas submetidas a lavagem com 2x SSC / 0,3% Igepal CA-630 (Sigma), em banho-maria a 72°C, por dois minutos, com agitação. Posteriormente, as mesmas foram lavadas em solução 2xSSC por dois minutos. Finalmente, foram então aplicados 15µl de DAPI/*antifade* 1:1 (Vector Laboratories, CA, USA) sobre o material de interesse, coberto com lamínula e armazenado a -20°C, em recipiente escuro, por pelo menos duas horas antes da análise.

Foram analisadas e documentadas dez metáfases por experimento, utilizando-se microscópio de fluorescência Axio Imager.D2 (Zeiss), objetiva Plan APO 100x, acoplado a um sistema computadorizado de análise (MetaSystems, Germany) do Laboratório de Citogenética do HCRP, por meio do *software* ISIS. Os critérios de análise de células metafásicas foram descritos por Bayani e Squire (2004). As metáfases foram selecionadas quando o sinal de hibridação era facilmente identificado, ou seja, quando sua intensidade era consistentemente maior que a intensidade de ligações não específicas ao citoplasma e restos celulares. Foram selecionadas apenas metáfases isoladas, sem sobreposições.

4.3.1.3 – Técnica de mBand

O protocolo utilizado foi similar à técnica de FISH em preparações com metáfases. Os *cocktails* de sondas específicos para determinado cromossomo ou braço cromossômico foram selecionados de acordo com os resultados obtidos pela citogenética convencional. Utilizamos sondas para os cromossomos 1, 11 e 12 (Kit 24XCyte, Metasystems, EU).

As lâminas foram incubadas em 2xSSC a 70°C por 3 minutos, e em seguida em 0,1xSSC a temperatura ambiente por 1 minuto. As metáfases foram denaturadas em solução de 0,07N NaOH por 1 minuto, imediatamente transferidas para 0,1xSSC a 4°C por 1 minuto e 2xSSC a 4°C por 1 minuto. As lâminas foram desidratadas em série de etanol (30%, 50%, 70%, 100% por 1 minuto cada). As preparações metafásicas foram hibridadas de acordo com as instruções do fornecedor das sondas específicas (MetaSystems, Alemanha). A sonda foi denaturada por incubação a 75°C por 5min seguida por pré-hibridação a 37°C por 30min. Banhos pós hibridação incluirão lavagem em solução de 1xSSC a 75°C por 5 min, seguida de 5 minutos em 4xSSC/0.05% Tween 20. A etapa de *blocking* foi realizada a 37°C por 10 minutos antes da etapa de detecção de sinal a 37°C por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em 4xSSC/0.05% Tween 20 por 2x 3 minutos e coradas com DAPI/antifade (Vector-USA).

O uso de cromossomos normais permitiu a geração de “*optimal false-color classifiers*” (classificação colorizada das bandas), necessária para a análise pelo *software* ISIS de imagem (MetaSystems, Altussheim, Germany) (LIM *et al.*, 2005). Para cada um dos experimentos, imagens de 10 metáfases foram capturadas em microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus equipado com filtros apropriados, acoplado a sistema MetaSystems (Alemanha) contendo *software* ISIS 3.

Essa metodologia foi realizada no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da FMRP-USP (Hibridação) e no Laboratório de Citogenética do HCRP-USP (detecção, análise e documentação).

4.3.2 - Estudo Citogenômico

4.3.2.1 - Extração de DNA

A amostra de sangue periférico total foi colhida com auxílio de agulha e seringa e transferido para tubo com EDTA. Foi utilizado 200uL deste sangue total, sendo este transferido para um microtubo (eppendorf). A extração foi realizada utilizando o kit de extração Masterpure Epicentre (USA, 2013). Adicionamos 600uL de Solução Red Cell Lysis e invertemos o tubo três vezes ao menos, para misturar, e então ressuspendemos o material. Este foi então incubado à temperatura ambiente, por cinco minutos e agitado (com vortex) brevemente. Estas duas etapas foram repetidas por mais uma vez, respectivamente. O tubo foi centrifugado por 25 segundos em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido e o

centrifugado (pellet) ressuspendido com 300 uL da solução Tissue and Cell Lysis. A amostra foi homogeneizada através de pipeta. Foi adicionado 1 uL de RNase A e incubada a 37°C por 30 minutos.

Para precipitação da amostra lisada, foi adicionado 300 uL da amostra e 150 uL de MPC Protein Precipitation Reagent e agitado vigorosamente em vórtice durante 10 segundos. Centrifugamos (em microcentrífuga) a 4°C por 10 minutos a $\geq 10,000$ g. O sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo. Foram adicionados 500 uL de isopropanol ao sobrenadante recuperado e invertidos os tubos de 30 a 40 vezes. Centrifugamos (microcentrífuga) a 4°C por 10 minutos a $\geq 10,000$ g. O isopropanol foi descartado e a amostra foi lavada com solução de etanol 70%. O etanol foi descartado a amostra foi seca em temperatura ambiente. A amostra foi ressuspendida em 35 uL de ddH₂O (Água Livre de DNA/RNA).

4.3.2.2 – Array CGH

A técnica de *array*-CGH foi realizada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC/FMRP), Laboratório de Hematologia, coordenado pelo Professor Dr. Rodrigo Panepucci.

Para a realização da técnica de *array*-CGH, foi utilizado o chip Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA). Esta plataforma possui 411.056 sondas em regiões não-variantes do genoma, em espaçamento médio de 5,3kb. A técnica permite a detecção de variações de número de cópias (CNVs), bem como sequências não relacionadas às CNVs em todo o genoma.

A primeira etapa foi a de fragmentação do DNA extraído de cada paciente utilizando o genomic DNA enzymatic labeling kit (Agilent). A solução de digestão foi preparada segundo protocolo para 16 reações, sendo oito para o DNA dos pacientes e oito para os DNAs controles feminino ou masculino, adquiridos da mesma empresa. Sendo assim, foram adicionados 34 uL de água nuclease-free, 44,2 uL de tampão 10x, 3,4 uL de BSA acetilado (10mg/uL) e 8,5 uL de cada uma das enzimas de restrição Alu I (10 U/uL) e Rsa I (10U/uL). Foram adicionados 5,8 uL deste mix a cada tubo de reação contendo 20,2 uL de DNA genômico, completando um volume de 26 uL. Os tubos foram então levados ao termociclador, programado para manter as amostras a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos, para inativação das enzimas, e então manter a 4°C até a finalização manual do

programa. A verificação do tamanho dos fragmentos gerados foi feita com 2µL em gel de agarose 1%, devendo apresentar entre 200 a 800 bp.

Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e DNA controle com fluoróforos. Inicialmente, foram adicionados às amostras 5µL de *random primer* e novamente submetidas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 95°C e o segundo a 4°C até a finalização manual. Então, uma mistura de 8 reações para cada fluoróforo foi preparada segundo o protocolo. Foram adicionados 50µL de água nuclease-free, 250µL de tampão de reação 5x, 125µL de dNTPs 10x, 75µL do fluoróforo Cyanine 3-dUTP em um dos tubos e, no restante, 75µL do fluoróforo Cyanine 5-dUTP, e finalmente 25µL de ExoKlenow. Foram adicionados, então, 21µL do Mix de marcação em cada tubo de reação contendo o DNA genômico, totalizando um volume de 50µL cada. As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando o mesmo programa da etapa de fragmentação.

A terceira etapa foi a de purificação, realizada com filtros Amicon 30kDa. Primeiramente, foram adicionados, a cada amostra, 430µL de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrifuga e carregados com cada DNA marcado. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000xg, em temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, foram adicionados mais 480µL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrifuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto a 1.000x g, em temperatura ambiente, para coletar a amostra purificada. Então, foram coletados 1,5µL de cada amostra para a determinação do rendimento e da atividade específica. Para equiparar a marcação de todas as amostras, estas foram diluídas em TE 1x, conforme as concentrações de cada amostra, para finalizar um volume de 40µL cada, com níveis de marcações semelhantes. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com cyanine-5 e cyanine-3, foram combinadas em um único mix, com adição de 2µL de TE 1x, completando um volume total final de 79µL.

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

Na etapa de hibridação, 245µL do mix de hibridação misturados ao DNA foram depositados nos poços da lamínula, que foi unida virada para baixo a uma lâmina de

hibridação e envolvida por uma câmara. A mesma câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 65°C, 20rpm, por 40 horas.

Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, a lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem OligoCGH I em temperatura ambiente. A lâmina teste foi então lavada, sendo a primeira lavagem feita com tampão OligoCGH I, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão OligoCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em acetonitrila, também em agitação magnética, por 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos.

Após as lavagens, as lâminas foram imediatamente posicionadas no suporte SureScan para serem escaneadas em seguida. Para o escaneamento das lâminas de microarray, utilizamos o Agilent SureScan C Scanner G2505. Para a análise das imagens, utilizamos o *software* “The Feature Extraction” v10.5.

4.3.3 - Metodologia de Análise

Os dados gerados foram analisados com o auxílio do *software* Nexus 7.0. A licença para uso deste software foi gentilmente cedida pelo laboratório do professor Jeremy Squire, por meio de acordo de cooperação científica entre a Queen’s University, em Kingston, Canada e a Universidade de São Paulo. O Nexus 7.0 foi configurado com o *Fast Adaptive States Segmentation Technique* (FASST2), com um limiar de significância de 1.0E-5 e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 1.000kb. Sinais alterados deveriam incluir três ou mais sondas adjacentes para serem considerados. Foi estimado ganho um limiar de 0,42; alto ganho, limiares de 1,14; perdas, -0,62; e perdas em homozigose, 1,1. A interpretação dos dados foi realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados, como o Genome Browser, o ISCA, o Decipher7.0, o RefSeq, o OMIM e o PubMed.

Resultados

5.0 – RESULTADOS

Foram analisados dez pacientes, com investigação de treze indivíduos com aberrações cromossômicas. Sete casos foram investigados isoladamente. Para três pacientes foi realizada investigação familiar, sendo três indivíduos da família A (o paciente e seus pais) e três da família B composta por dois meio irmãos e seu pai. O histórico clínico, dados positivos do exame físico, heredograma e resultado do cariótipo dos pacientes estão descritos no anexo I.

Após exame médico clínico e realização do cariótipo convencional por bandamento GTG, realizamos investigação genômica dos indivíduos selecionados utilizando a plataforma de a-CGH (Hibridação Genômica Comparativa em Microarranjo) 2x400K, Agilent (USA).

Para análise de ganhos e perdas genômicas utilizamos o *software* Nexus7.0, utilizando o FASST2 com um limiar de significância de $1.0E-5$ e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 1.000kb. As análises foram realizadas com o nível de restringência máximo, com o valor mínimo de três sondas adjacentes, e o sistema de correção do catálogo Agilent 2x400k_021850_20101001. Foi considerado ganho um limiar de 0,42; alto ganho, limiares de 1,14; perdas, -0,62; e perdas em homozigose, 1,1.

Os resultados referentes aos casos 4 e 9, foram validados por FISH. Os casos 1 e 7 também foram caracterizados pela técnica de mBand.

5.1 - Investigação Genômica de Paciente com Inversão do Cromossomo 12 (Caso 1)

O paciente 1 apresentava diagnóstico citogenético de inversão paracentrica do cromossomo 12 e cariótipo 46,XY,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2 e foi investigado em conjunto com seus pais (pacientes 2 e 3), identificados como família A.

Sua mãe (identificada como paciente 2) apresentava cariótipo 46,XX,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2 e seu pai (identificado como paciente 3) era portador do cariótipo 46,XY,inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1). A pesquisa do heredograma evidenciou consanguinidade entre os genitores, primos em 2º grau (anexo I).

A análise genômica do paciente 1 por aCGH evidenciou sete alterações, todas eram ganhos genéticos, sendo duas regiões de alto ganho. Entre as regiões cromossômicas com ganhos estão uma localizada no cromossomo 15, com 20673632067363bp na região 20,457,306-22,524,668; outra localizada no cromossomo 16, de 305239bp na região

34,462,331-34,767,569; uma no cromossomo X, de 169608 bp na região 0-169,607; outra no cromossomo 8, de 167185bp na região 2,345,049-2,512,233; e uma no cromossomo 12, de 113454bp na região 19,466,795-19,580,248. As regiões com altos ganhos foram encontradas no cromossomo 4, de 40661bp na região 3,656,364-3,697,024, e no cromossomo 16, de 20908bp na região 16,178,653- 16,199,560.

As alterações encontradas no paciente 1 estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição das alterações encontradas no paciente 1, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
2067363	chr15: 20,457,306-22,524,668	Ganho	q11.1 - q11.2	67	16	<i>CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, NBEAP1, POTEb, NF1P2, CT60, LOC646214, CXADRP2, POTEb, NF1P2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P</i>
305239	chr16: 34,462,331-34,767,569	Ganho	p11.2 - p11.1	23	3	<i>LOC283914, LOC146481, LOC100130700</i>
169608	chrX: 0-169,607	Ganho	p22.33	4	0	
167185	chr8: 2,345,049-2,512,233	Ganho	p23.2	21	0	
113454	chr12: 19,466,795-19,580,248	Ganho	p12.3	19	1	<i>PLEKHA5</i>
40661	chr4: 3,656,364-3,697,024	Alto ganho	p16.3	5	1	<i>LOC100133461</i>
20908	chr16: 16,178,653-16,199,560	Alto ganho	p13.11	5	1	<i>ABCC1</i>

A análise do aCGH da paciente 2 (mãe do paciente 1) revelou onze alterações. Destas, dez ganhos (com três regiões de alto ganho) e uma região de perda de cópia em homozigose. Os ganhos foram encontrados no cromossomo 14, de 1047255 bp na região 19,376,762-20,424,016; no cromossomo 16, de 290869bp na região 34,462,331-34,753,199; no cromossomo X, de 233451bp na região 1,014,601-1,248,051, e alto ganho de 169608bp na região 0-169,607; no cromossomo 17, de 179230bp na região 44,168,836-44,348,065, e de alto ganho de 34065bp na região 2,437,073-2,471,137; no cromossomo 8, de 158628bp na região 39,230,689-39,389,316; no cromossomo 12, de 113454bp na região 19,466,795-19,580,248; no cromossomo 1, de 94927bp na região 248,715,191-248,810,117, e de alto ganho de 40122bp na região 245,271,413-245,311,534. Foi detectada a perda em homozigose no cromossomo 11, de 23816bp na região 7,810,381-7,834,196.

As alterações encontradas na paciente 2 seguem descritas na Tabela 3.

A análise genômica do paciente 3 (pai do paciente 1) apresentou sete alterações. Destas, três foram ganhos, e cinco foram perdas. Das perdas, duas delas foram em homozigose. Os ganhos foram observados no cromossomo 2, de 712599bp na região 133,984,136-134,696,734; no cromossomo 16, de 243628bp na região 34,477,059-34,720,686; e no cromossomo 12, de 100558bp na região 19,479,691-19,580,248. Ocorreram perdas no cromossomo 18, de 67235bp na região 29,321,362-29,388,596, e no cromossomo 11, de 28808bp na região 21,187,415-21,216,222. Houve perda em homozigose no cromossomo 15, de 48411bp na região 34,753,000-34,801,410 e no cromossomo 13, de 33923bp na região 57,756,454-57,790,376.

As alterações encontradas no paciente 3 estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3 - Descrição das alterações encontradas na paciente 2, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
1047255	chr14: 19,376,762-20,424,016	Ganho	q11.2	35	15	<i>OR11H12, LOC642426, POTE, LINC00516, LOC101101776, LINC00516, LOC101101776, POTE, OR11H2, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>
290869	chr16: 34,462,331-34,753,199	Ganho	p11.2 - p11.1	22	3	<i>LOC283914, LOC146481, LOC100130700</i>
233451	chrX: 1,014,601-1,248,051	Ganho	p22.33	19	0	
179230	chr17: 44,168,836-44,348,065	Ganho	q21.31	24	2	<i>KANSL1, KANSL1-AS1</i>
169608	chrX: 0-169,607	Alto ganho	p22.33	4	0	
158628	chr8: 39,230,689-39,389,316	Ganho	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
113454	chr12: 19,466,795-19,580,248	Ganho	p12.3	19	1	<i>PLEKHA5</i>
94927	chr1: 248,715,191-248,810,117	Ganho	q44	15	5	<i>OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
40122	chr1: 245,271,413-245,311,534	Alto ganho	q44	8	1	<i>EFCAB2</i>
34065	chr17: 2,437,073-2,471,137	Alto ganho	p13.3	6	0	
23816	chr11: 7,810,381-7,834,196	Perda em homozigose	p15.4	6	1	<i>OR5P2</i>

Tabela 4 - Descrição das alterações encontradas no paciente 3, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
712599	chr2: 133,984,136-134,696,734	Ganho	q21.2	100	1	<i>NCKAP5</i>
243628	chr16: 34,477,059-34,720,686	Ganho	p11.2 - p11.1	19	2	<i>LOC283914</i> , <i>LOC146481</i>
100558	chr12: 19,479,691-19,580,248	Ganho	p12.3	17	1	<i>PLEKHA5</i>
67235	chr18: 29,321,362-29,388,596	Perda	q12.1	9	1	<i>SLC25A52</i>
48411	chr15: 34,753,000-34,801,410	Perda em homozigose	q14	8	0	
33923	chr13: 57,756,454-57,790,376	Perda em homozigose	q21.1	6	0	
28808	chr11: 21,187,415-21,216,222	Perda	p15.1	9	1	<i>NELL1</i>

O resultado final da investigação citogenômica dos pacientes 1, 2 e 3 foi:

Paciente 1: arr[hg19] Xp22.33(0-169,607)x3,4p16.3(3,656,364-3,697,024)x4, 8p23.2(2,345,049-2,512,233)x3,12p12.3(19,466,795-19,580,248)x3,15q11.1q11.2(20,457,306-22,524,668)x3,16p11.1p11.2(34,462,331-34,767,569)x3, 16p13.11(16,178,653- 16,199,560)x4.

Paciente 2: arr[hg19] Xp22.33(0-169,607)x4,Xp22.33(1,014,601-1,248,051)x3, 1q44(248,715,191-248,810,117)x3,1q44(245,271,413-245,311,534)x4,8p11.22(39,230,689-39,389,316)x3,12p12.3(19,466,795-19,580,248)x3,11p15.4(7,810,381-7,834,196)x0,14q11.2(19,376,762-20,424,016)x3,16p11.1p11.2(34,462,331-34,753,199)x3,17p13.3(2,437,073-2,471,137)x4,17q21.31(44,168,836-44,348,065)x3.

Paciente 3: arr[hg19] 2q21.2(133,984,136-134,696,734)x3,11p15.1(21,187,415-21,216,222)x1,12p12.3(19,479,691-19,580,248)x3,13q21.1(57,756,454-57,790,376)x0,15q14(34,753,000-34,801,410)x0,16p11.1-p11.2(34,477,059-34,720,686)x3,18q12.1(29,321,362-29,388,596)x1.

Após análise individual dos pacientes 1, 2 e 3, os resultados positivos envolvendo ganhos e perdas em diferentes regiões do genoma foram comparados, como demonstra a figura 5.

Figura 5 - Comparação de perdas e ganhos nos genomas do Paciente 1 e dos seus genitores. A parte superior do gráfico mostra as porcentagens de alterações na família e, na parte inferior, as alterações individuais.

Para caracterização do rearranjo cromossômico e definição do diagnóstico citogenético, foi realizada a técnica de mBand no paciente 1. O resultado pode ser visualizado na figura 6.

chr. 12 - normal lymphocyte

chr. 12 - patient #5208 lymphocyte

Figura 6 - mBand demonstrando, na parte superior, o esperado para um cromossomo 12 normal. A parte inferior evidencia as inversões em 12p e 12q em dois cromossomos 12 de duas células diferentes do paciente 1. Kit de sondas de mBand utilizadas para o cromossomo 12 (24XCyte, Metasystems, EU).

5.2 - Investigação Genômica de Paciente com Translocação Familiar 4p;8p (caso 2)

A paciente 4 apresentava diagnóstico citogenético de trissomia parcial 8p devido a translocação herdada 4p;8p e cariótipo 46,XX,der(4)t(4;8)(p16;p23.1)pat. Seu meio irmão paterno (paciente 5) apresentava cariótipo 46,XY,der(4)t(4;8)(p16;p23.1)pat. Ambos apresentavam fenótipo de anomalias congênicas associadas a atraso de desenvolvimento. Ao serem investigados juntamente com seus genitores, foi observado que herdaram uma translocação aparentemente balanceada no pai, o paciente 6, portador do cariótipo 46,XY, t(4;8)(p16;p23.1) e fenótipo de hipercolesterolemia.

Realizamos investigação genômica da paciente 4, de seu meio irmão (paciente 5) e de seu pai (paciente 6), sendo identificados como família B.

O aCGH da paciente 4 revelou dezoito alterações distribuídas em sete cromossomos, sendo dez ganhos e oito perdas. Houve três ganhos no cromossomo 8, sendo um de 10616470bp na região 1,819,304-12,435,773, outro de 1775068bp na região 0-1,775,067, e o terceiro de 158628bp na região 39,230,689-39,389,316. No cromossomo 14, houve ganho de 826079bp na região 19,597,938-20,424,016. No cromossomo 12, houve ganho de 135137bp na região 7,989,583-8,124,719. No cromossomo 1, ganho de 94927bp na região 248,715,191-248,810,117. No cromossomo 11, ganho de 67243bp na região 55,364,925-55,432,167. No cromossomo 20, houve um alto ganho de 29410bp na região 1,561,076-1,590,485. Entre as perdas, foram encontradas deleções no cromossomo 1 e no cromossomo 4. No cromossomo 1 houve perda de 83484bp, em homozigose, na região 196,727,194-196,810,677. No cromossomo 4 houve deleções de 709538bp na região 78,427-578,373, de 499947bp na região 78,427-578,373, de 361930bp na região 2,842,143-3,204,072, de 190746bp na região 1,097,919-1,288,664, de 127599bp na região 3,697,024-3,824,622, de 111930bp na região 2,660,382-2,772,311, e houve perda em homozigose de 156151bp, na região 69,389,830-69,545,980.

As alterações encontradas na paciente 4 seguem descritas na Tabela 5.

A avaliação citogenômica do paciente 5 mostrou quinze alterações, com dez ganhos e cinco perdas. Entre os ganhos, quatro foram detectados no cromossomo 8, de 8355523bp na região 2,045,930-10,401,452, de 930795bp na região 10,952,594-11,883,388, de 52820bp na região 1,724,505-1,777,324, e de 51893bp na região 57,050,345-57,102,237. Foram também detectados ganhos no cromossomo 15, de 1342375bp na região 20,311,729-21,654,103; no

cromossomo 5, de 379075bp, na região 70,308,101-70,687,175; dois ganhos no cromossomo 12, um de 135137bp na região 7,989,583-8,124,719, e outro de 32340bp na região 50,418,087-50,450,426; no cromossomo X, de 110235bp na região 47,876,632-47,986,866; e no cromossomo 9, de 27504bp, na região 133,550,564-133,578,067. As cinco perdas foram localizadas no cromossomo 4, de 792414bp na região 1,907,454-2,699,867, de 546515bp na região 69,881-616,395, de 388048bp na região 2,993,333-3,381,380, de 248415bp na região 1,083,470-1,331,884, e de 84415bp na região 2,842,143-2,926,557.

As alterações encontradas no paciente 5 estão descritas na Tabela 6.

Tabela 5 - Descrição das alterações encontradas na paciente 4, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0 (Continua).

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
10616470	chr8: 1,819,304-12,435,773	Ganho	p23.3 - p23.1	1434	126	<i>ARHGEF10, KBTBD11, MYOM2, CSMD1, LOC100287015, MCPH1, ANGPT2, AGPAT5, MIR4659A, MIR4659B, XKR5, LOC100652791, DEFB1, DEFA6, DEFA4, DEFA8P, DEFA9P, DEFA10P, DEFA1, DEFA1B, DEFT1P2, DEFT1P, DEFA1, DEFA1B, DEFT1P2, DEFT1P, DEFA3, DEFA1, DEFA1B, DEFA11P, DEFA5, LOC349196, LOC349196, LOC349196, DEFB109P1B, FAM66B, USP17L1P, USP17L4, ZNF705G, DEFB4B, DEFB103B, DEFB103A, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106A, DEFB106B, DEFB105A, DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, FAM90A7P, FAM90A7P, FAM90A10P, DEFB107A, DEFB107B, DEFB105A, DEFB105B, DEFB106A, DEFB106B, DEFB104A, DEFB104B, SPAG11B, SPAG11A, DEFB103A, DEFB103B, DEFB4A, ZNF705B, USP17L8, USP17L3, FAM66E, DEFB109P1B, MIR548I3, FAM86B3P, SGK223, CLDN23, MFHAS1, ERI1, MIR4660, PPP1R3B, LOC157273, TNKS, MIR597, LINC00599, MIR124-1, MSRA, PRSS55, RP1L1, C8orf74, SOX7, PINX1, MIR1322, MIR598, XKR6, MTMR9, SLC35G5, TDH, C8orf12, FAM167A, BLK, LINC00208, GATA4, NEIL2, FDFT1, CTSB, DEFB136, DEFB135, DEFB134, DEFB130, LOC100133267, ZNF705D, LOC392196, USP17L7, FAM66D, USP17L2, FAM90A2P, FAM86B1, DEFB130, LOC100133267, LOC649352, FAM66A, DEFB109P1, FAM90A25P, FAM86B2, LOC100506990, LOC729732</i>
1775068	chr8: 0-1,775,067	Ganho	p23.3	232	12	<i>OR4F21, RPL23AP53, ZNF596, FBXO25, C8orf42, ERICH1, ERICH1-AS1, LOC286083, DLGAP2, CLN8, MIR596, ARHGEF10</i>
826079	chr14: 19,597,938-20,424,016	Ganho	q11.2	31	12	<i>LINC00516, LOC101101776, LINC00516, LOC101101776, POTEM, OR11H2, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>
709538	chr4: 1,907,454-2,616,991	Perda	p16.3	142	13	<i>WHSC1, SCARNA22, MIR943, WHSC2, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, LOC402160, RNF4</i>

Tabela 5 - Descrição das alterações encontradas na paciente 4, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0 (Conclusão).

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
499947	chr4: 78,427-578,373	Perda	p16.3	90	8	<i>ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG</i>
361930	chr4: 2,842,143-3,204,072	Perda	p16.3	69	8	<i>SH3BP2, ADD1, MFSD10, NOP14-AS1, NOP14, GRK4, HTT-AS1, HTT</i>
190746	chr4: 1,097,919-1,288,664	Perda	p16.3	33	7	<i>RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1, CTBP1-AS1, MAEA</i>
158628	chr8: 39,230,689-39,389,316	Ganho	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
156151	chr4: 69,389,830-69,545,980	Perda em homozigose	q13.2	11	2	<i>UGT2B17, UGT2B15</i>
135137	chr12: 7,989,583-8,124,719	Ganho	p13.31	25	2	<i>SLC2A14, SLC2A3</i>
127599	chr4: 3,697,024-3,824,622	Perda	p16.3	19	1	<i>ADRA2C</i>
111930	chr4: 2,660,382-2,772,311	Perda	p16.3	19	2	<i>FAM193A, TNIP2</i>
94927	chr1: 248,715,191-248,810,117	Ganho	q44	15	5	<i>OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>
83484	chr1: 196,727,194-196,810,677	Perda em homozigose	q31.3	5	2	<i>CFHR3, CFHR1</i>
67243	chr11: 55,364,925-55,432,167	Ganho	q11	12	3	<i>OR4C11, OR4P4, OR4S2</i>
29410	chr20: 1,561,076-1,590,485	Alto ganho	p13	6	1	<i>SIRPB1</i>

Tabela 6 - Descrição das alterações encontradas no paciente 5, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0 (Continua).

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
8355523	chr8: 2,045,930-10,401,452	Ganho	p23.3 - p23.1	1101	85	MYOM2, CSMD1, LOC100287015, MCPH1, ANGPT2, AGPAT5, MIR4659A, MIR4659B, XKR5, LOC100652791, DEFB1, DEFA6, DEFA4, DEFA8P, DEFA9P, DEFA10P, DEFA1, DEFA1B, DEFT1P2, DEFT1P, DEFA1, DEFA1B, DEFT1P2, DEFT1P, DEFA3, DEFA1, DEFA1B, DEFA11P, DEFA5, LOC349196, LOC349196, LOC349196, DEFB109P1B, FAM66B, USP17L1P, USP17L4, ZNF705G, DEFB4B, DEFB103B, DEFB103A, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106A, DEFB106B, DEFB105A, DEFB105B, DEFB107A, DEFB107B, FAM90A7P, FAM90A7P, FAM90A10P, DEFB107A, DEFB107B, DEFB105A, DEFB105B, DEFB106A, DEFB106B, DEFB104A, DEFB104B, SPAG11B, SPAG11A, DEFB103A, DEFB103B, DEFB4A, ZNF705B, USP17L8, USP17L3, FAM66E, DEFB109P1B, MIR548I3, FAM86B3P, SGK223, CLDN23, MFHAS1, ER11, MIR4660, PPP1R3B, LOC157273, TNKS, MIR597, LINC00599, MIR124-1, MSRA, PRSS55
1342375	chr15: 20,311,729-21,654,103	Ganho	q11.1 - q11.2	37	8	CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, NBEAP1, POTE8, NF1P2, CT60
930795	chr8: 10,952,594-11,883,388	Ganho	p23.1	163	15	XKR6, MTMR9, SLC35G5, TDH, C8orf12, FAM167A, BLK, LINC00208, GATA4, NEIL2, FDFT1, CTSB, DEFB136, DEFB135, DEFB134
792414	chr4: 1,907,454-2,699,867	Perda	p16.3	157	14	WHSC1, SCARNA22, MIR943, WHSC2, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, LOC402160, RNF4, FAM193A
546515	chr4: 69,881-616,395	Perda	p16.3	96	8	ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG
388048	chr4: 2,993,333-3,381,380	Perda	p16.3	74	5	GRK4, HTT-AS1, HTT, MSANTD1, RGS12

Tabela 6 - Descrição das alterações encontradas no paciente 5, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0 (Conclusão).

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
379075	chr5: 70,308,101-70,687,175	Ganho	q13.2	4	5	<i>NAIP, GTF2H2, LOC647859, GUSBP9, PMCHL2</i>
248415	chr4: 1,083,470-1,331,884	Perda	p16.3	44	7	<i>RNF212, TMED11P, SPON2, LOC100130872, CTBP1, CTBP1-AS1, MAEA</i>
135137	chr12: 7,989,583-8,124,719	Ganho	p13.31	25	2	<i>SLC2A14, SLC2A3</i>
110235	chrX: 47,876,632-47,986,866	Ganho	p11.23	16	3	<i>ZNF630, SSX6, SPACA5</i>
84415	chr4: 2,842,143-2,926,557	Perda	p16.3	14	2	<i>SH3BP2, ADD1</i>
52820	chr8: 1,724,505-1,777,324	Ganho	p23.3	17	3	<i>CLN8, MIR596, ARHGEF10</i>
51893	chr8: 57,050,345-57,102,237	Ganho	q12.1	8	1	<i>PLAG1</i>
32340	chr12: 50,418,087-50,450,426	Ganho	q13.12	8	1	<i>RACGAP1</i>
27504	chr9: 133,550,564-133,578,067	Ganho	q34.12	6	2	<i>PRDM12, EXOSC2</i>

A investigação genômica do paciente 6, pai dos pacientes 4 e 5, detectou oito alterações, sendo cinco ganhos e três perdas, sendo duas destas em homozigose. Foram encontrados um ganho no cromossomo 8, de 158628bp na região 39,230,689-39,389,316; três ganhos no cromossomo 12, um de 139929bp na região 7,989,583-8,129,511, outro de 125620bp na região 84,847,069-84,972,688, e um terceiro de 96011bp na região 9,631,091-9,727,101; e um ganho no cromossomo 11, de 67243bp na região 55,364,925-55,432,167. Entre as perdas, estas foram localizadas no cromossomo 4, de 156151bp, em homozigose, na região 69,389,830-69,545,980; no cromossomo 16, de 75998bp na região 237,454-313,451; e no cromossomo 3, em homozigose, de 26489bp na região 89,392,638-89,419,126.

As alterações encontradas no paciente 6 estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Descrição das alterações encontradas no paciente 6, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
158628	chr8: 39,230,689-39,389,316	Ganho	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
156151	chr4: 69,389,830-69,545,980	Perda em homozigose	q13.2	11	2	<i>UGT2B17, UGT2B15</i>
139929	chr12: 7,989,583-8,129,511	Ganho	p13.31	26	2	<i>SLC2A14, SLC2A3</i>
125620	chr12: 84,847,069-84,972,688	Ganho	q21.31	7	0	
96011	chr12: 9,631,091-9,727,101	Ganho	p13.31	11	0	
75998	chr16: 237,454-313,451	Perda	p13.3	14	2	<i>LUC7L, ITFG3</i>
67243	chr11: 55,364,925-55,432,167	Ganho	q11	12	3	<i>OR4C11, OR4P4, OR4S2</i>
26489	chr3: 89,392,638-89,419,126	Perda em homozigose	p11.1	5	1	<i>EPHA3</i>

Pudemos, então, definir o diagnóstico citogenômico dos pacientes 4, 5 e 6:

Paciente 4: arr[hg19] 1q31.3(196,727,194-196,810,677)x0,1q44(248,715,191-248,810,117)x3,4p16.3(78,427-578,373)x1,4p16.3(1,097,919-1,288,664)x1, 4p16.3(1,907,454-2,616,991)x1,4p16.3(2,660,382-2,772,311)x1,4p16.3(2,842,143-3,204,072)x1,4p16.3(3,697,024-3,824,622)x1,4q13.2(69,389,830-69,545,980)x0,8p11.22(39,230,689-39,389,316)x3,8p23.1p23.3(1,819,304-12,435,773)x3,8p23.3(0-1,775,067)x3,11q11(55,364,925-55,432,167)x3,12p13.31(7,989,583-8,124,719)x3,14 q11.2(19,597,938-20,424,016)x3,20p13(1,561,076-1,590,485)x4.

Paciente 5: arr[hg19] Xp11.23(47,876,632-47,986,866)x3,4p16.3(69,881-616,395)x1,4p16.3(1,083,470-1,331,884)x1,4p16.3(1,907,454-2,699,867)x1,4p16.3(2,842,143-2,926,557)x1,4p16.3(2,993,333-3,381,380)x1,5q13.2(70,308,101-70,687,175)x3,8p23.1p23.3(2,045,930-10,401,452)x3,8p23.1(10,952,594-11,883,388)x3,8p23.3(1,724,505-1,777,324)x3,8q12.1(57,050,345-57,102,237)x3,15q11.11q11.2(20,311,729-21,654,103)x3,12q13.12(50,418,087-50,450,426)x3,12p13.31(7,989,583-8,124,719)x3,9q34.12(133,550,564-133,578,067)x3.

Paciente 6: arr[hg19] 3p11.1(89,392,638-89,419,126)x0,4q13.2(69,389,830-69,545,980)x0,8p11.22(39,230,689-39,389,316)x3,11q11(55,364,925-55,432,167)x3,12p13.31(7,989,583-8,129,511)x3,12q21.31(84,847,069-84,972,688)x3,12p13.31(9,631,091-9,727,101)x3,16p13.3(237,454-313,451)x1.

Após análise individual dos pacientes 4, 5 e 6, os resultados dos ganhos e perdas genômicas foram colocados lado a lado, para comparação das alterações dectadas nos pacientes 3 e 4 e em seu pai, portador da translocação aparentemente equilibrada (figura 7).

Figura 7 - Comparação de perdas e ganhos nos genomas dos Pacientes 4, 5 e 6 (pai). A parte superior do gráfico mostra as porcentagens de alterações na família e, na parte inferior, as alterações individuais.

A técnica de FISH, utilizando a sonda WCPchr8 (Cytocell LPP08R), que marca todo o cromossomo 8 em vermelho, confirmou a presença de translocação no paciente 5 (figura 8) e no paciente 6 (figura 9).

Figura 8 - Resultado da técnica de FISH do Paciente 5, utilizando a sonda WCPchr8 (Cytocell LPP08R), marcando o cromossomo 8 em vermelho, evidenciando a presença da translocação.

Figura 9 - Resultado da técnica de FISH do Paciente 6, utilizando a sonda WCPchr8 (Cytocell LPP08R), marcando o cromossomo 8 em vermelho, evidenciando a presença da translocação.

5.3 - Investigação Genômica de Paciente com Anel do Cromossomo 11 (caso 3)

O paciente 7 apresentava fenótipo principal de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e distúrbio de comportamento, com cariótipo 45,XY,-11[18]/46,XY,r(11)[78]/46,XY,dicr(11;11)[4].

A avaliação por aCGH detectou sete alterações, sendo quatro perdas (duas em homozigose) e três ganhos. Foram encontradas perdas no cromossomo 11, de 8638367bp na região 126,368,150-135,006,516; no cromossomo 2, de 307664bp na região 242,891,710-243,199,373; no cromossomo 8, de 158628bp em homozigose, na região 39,230,689-39,389,316 e no cromossomo 6, de 39695bp em homozigose, na região 32,495,182-32,534,876. Foram encontrados três ganhos, sendo um no cromossomo 15, de 2565100bp na região 20,102,541-22,667,640 e dois no cromossomo 11, de 67243bp na região 55,364,925-55,432,167 e de 55945bp na região 920,103-976,047.

As alterações encontradas no paciente 7 encontram-se descritas na Tabela 8. Foi então estabelecido o diagnóstico citogenômico: arr[hg19] 2q37.3(242,891,710-243,199,373)x1,6p21.32(32,495,182-32,534,876)x0,8p11.22(39,230,689-39,389,316)x0,11p15.5(920,103-976,047)x3,11q11(55,364,925-55,432,167)x3,11q24.2q25(126,368,150-135,006,516)x1,12p11.21(31,348,779-31,420,500)x3,14q32.33(106,528,911-106,555,564)x0,15q11.1q11.2(20,102,541-22,667,640)x3.

Inicialmente foi realizada a técnica de FISH para confirmação da origem do cromossomo em anel, e a presença de deleção da região telomérica do cromossomo 11, utilizando as sondas 11qtel38 Green (LPT11q-Green) e 11ptel03 Red(LPT11p-Red) (Cytocell,UK). Os resultados da hibridação encontram-se na figura 10.

Posteriormente, a técnica de FISH foi aplicada para confirmação da deleção da região 126,368,150-135,006,516 do cromossomo 11 utilizando as sondas SureFISH Agilent G100333-Red 11q25 (região:133935398-134140426) e G100071-Green 11qtel (região: 134649534-134945261). A figura 11 valida os resultados da técnica de array-CGH.

Tabela 8 - Descrição das alterações encontradas no paciente 7, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
8638367	chr11:126,368,150-135,006,516	Perda	q24.2 - q25	1298	40	<i>KIRREL3, KIRREL3-AS2, MIR3167, KIRREL3-AS3, ETS1, FLI1-AS1, FLI1, KCNJ1, C11orf45, KCNJ5, TP53AIP1, ARHGAP32, BARX2, TMEM45B, NFRKB, PRDM10, LINC00167, APLP2, ST14, ZBTB44, ADAMTS8, ADAMTS15, C11orf44, SNX19, NTM, OPCML, SPATA19, MIR4697, LOC283174, IGSF9B, LOC100128239, JAM3, NCAPD3, VPS26B, THYN1, ACAD8, GLB1L3, GLB1L2, B3GAT1, LOC283177</i>
2565100	chr15: 20,102,541-22,667,640	Ganho	q11.1 - q11.2	77	17	<i>CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, NBEAP1, POTEb, NF1P2, CT60, LOC646214, CXADRP2, POTEb, NF1P2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, REREP3</i>
307664	chr2: 242,891,710-243,199,373	Perda	q37.3	28	1	<i>LOC728323</i>
158628	chr8: 39,230,689-39,389,316	Perda em homozigose	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
67243	chr11 :55,364,925-55,432,167	Ganho	q11	12	3	<i>OR4C11, OR4P4, OR4S2</i>
55945	chr11 :920,103-976,047	Ganho	p15.5	11	1	<i>AP2A2</i>
39695	chr6: 32,495,182-32,534,876	Perda em homozigose	p21.32	6	2	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>

Figura 10 - Resultado da técnica de FISH utilizando as sondas verde LPT11q-Green (11qtel38- G) e vermelha LPT11p-Red (11ptel03- Red), evidenciando a perda da região terminal apenas do braço longo do cromossomo 11 em anel, pois este não possui sinal da sonda verde (11qtel), mas possui sinal da sonda vermelha (11ptel).

Figura 11 - Resultado da técnica de FISH utilizando as sondas G100333-Vermelha (11q25) e G100071-Verde (11qtel) evidenciando a ausência da região 11q21.2-q25 no cromossomo 11 em anel e presença de apenas um sinal verde e um vermelho no cromossomo 11 normal.

5.4. Investigação Genômica de Paciente com Material Adicional 12p (caso 4)

O paciente 8 apresentava fenótipo principal de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor associado a dismorfias e cariótipo 46,XY,add(12)(p13). O cariótipo dos pais foi normal, dificultando a elucidação da origem do material adicional.

A investigação citogenômica pela técnica de aCGH apresentou duas alterações correspondentes a ganhos: uma no cromossomo 12, de 21332916bp na região 9,891,335-31,224,250 e outra no cromossomo 11, de 38574bp na região 55,393,594-55,432,167.

As alterações encontradas encontram-se descritas na Tabela 9.

Assim, o diagnóstico por citogenômica do paciente 8 foi delimitado: arr[hg19]11q11(55,393,594-55,432,167)x3,12p11.21p13.31(9,891,335-31,224,250)x3.

Tabela 9 - Descrição das alterações encontradas no paciente 8, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
21332916	chr12: 9,891,335-31,224,250	Ganho	p13.31 - p11.21	3113	168	CD69, KLRF1, CLEC2B, KLRF2, CLEC2A, CLEC12A, CLEC1B, CLEC12B, CLEC9A, CLEC1A, CLEC7A, OLR1, TMEM52B, GABARAPL1, KLRD1, KLRK1, KLRC4-KLRK1, KLRC4, KLRC3, KLRC2, KLRC1, KLRAP1, MAGOHB, STYK1, CSDA, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R9, TAS2R10, PRR4, PRH1, TAS2R13, PRH2, TAS2R14, TAS2R50, TAS2R20, PRH1-PRR4, TAS2R19, TAS2R31, TAS2R46, TAS2R43, TAS2R30, LOC100129361, TAS2R42, PRB3, PRB4, PRB1, PRB2, LOC338817, ETV6, RNU6-19, BCL2L14, MIR1244-1, MIR1244-2, MIR1244-3, LRP6, MANSC1, LOH12CR2, LOH12CR1, DUSP16, CREBL2, GPR19, CDKN1B, APOLD1, MIR613, DDX47, RPL13AP20, GPRC5A, MIR614, GPRC5D, LOC100506314, HEBP1, HTR7P1, KIAA1467, GSG1, EMP1, C12orf36, GRIN2B, ATF7IP, PLBD1, GUCY2C, HIST4H4, H2AFJ, WBP11, C12orf69, C12orf60, ART4, MGP, ERP27, ARHGDIB, PDE6H, RERG, PTPRO, EPS8, STRAP, DERA, SLC15A5, MGST1, LMO3, SKP1P2, MIR3974, RERGL, PIK3C2G, PLCZ1, CAPZA3, PLEKHA5, AEBP2, LOC100506393, PDE3A, SLCO1C1, SLCO1B3, SLCO1B7, SLCO1B1, SLCO1A2, IAPP, PYROXD1, RECQL, GOLT1B, C12orf39, GYS2, LDHB, KCNJ8, ABCC9, CMAS, ST8SIA1, C2CD5, ETNK1, SOX5, MIR920, LINC00477, BCAT1, C12orf77, LRMP, CASC1, LYRM5, KRAS, IFLTD1, MIR4302, LOC100506451, RASSF8, BHLHE41, SSPN, ITPR2, ASUN, FGFR1OP2, TM7SF3, MED21, C12orf71, STK38L, ARNTL2, C12orf70, PPFIBP1, REP15, MRPS35, MANSC4, KLHDC5, PTHLH, CCDC91, FAR2, ERGIC2, LOC101055625, OVCH1, TMTC1, IPO8, CAPRIN2, LOC100287314, TSPAN11, DDX11-AS1
38574	chr11: 55,393,594-55,432,167	Ganho	q11	7	2	OR4P4, OR4S2

5.5 - Investigação Genômica de Paciente com Cromossomo Marcador Extranumerário (caso 5)

A paciente 9 apresentava fenótipo principal de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e cariótipo 47,XX,+mar em 100 metáfases.

A análise por aCGH detectou duas alterações: um ganho no cromossomo 4, de 240886bp na região 69,305,095-69,545,980 e uma perda no cromossomo 22, de 142274bp na região 25,773,078-25,915,351.

As alterações encontradas estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Descrição das alterações encontradas na paciente 9, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
240886	chr4: 69,305,095-69,545,980	Ganho	q13.2	12	3	<i>TMPRSS11E, UGT2B17, UGT2B15</i>
142274	chr22: 25,773,078-25,915,351	Perda	q11.23 - q12.1	28	2	<i>LRP5L, CRYBB2P1</i>

Assim, foi realizado o diagnóstico citogenético da paciente 9: arr[hg19] 4q13.2(69,305,095-69,545,980)x3,22q11.23q12.1(25,773,078-25,915,351)x1.

5.6 - Investigação Genômica de Paciente com Deleção do Braço Longo do Cromossomo 13 (caso 6)

O paciente 10 apresentava quadro fenotípico dismórfico e cariótipo 46,XY, del(13)(q31).

A investigação genômica por aCGH evidenciou seis alterações, sendo quatro perdas e dois ganhos. Foram encontradas duas perdas no cromossomo 13, de 25716994bp na região 89,041,417-114,758,410 e de 365312bp, na região 114,804,567-115,169,878. Além disso, foram detectadas uma perda no cromossomo 15, de 1779684bp na região 20,561,801-22,341,484 e uma perda no cromossomo 14, de 407230bp na região 19,999,034-20,406,263. Os ganhos foram encontrados nos cromossomos 16, de 306898bp na região 34,446,302-34,753,199 e no cromossomo 8, de 158628bp na região 39,230,689-39,389,316.

As alterações estão descritas na Tabela 11.

A partir destes resultados, pôde-se delimitar o diagnóstico citogenômico do paciente 10:

arr[hg19] 8p11.2(39,230,689-39,389,316)x3,13q31.2q34(89,041,417-114,758,410)x1,13q34(114,804,567-115,169,878)x1,14q11.2(19,999,034-20,406,263)x1,15q11.1-q11.2(20,561,801-22,341,484)x1,16p11.1p11.2(34,446,302-34,753,199)x3.

Tabela 11 - Descrição das alterações encontradas no paciente 10, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	N° Sondas	N° Genes	Genes
25716994	chr13: 89,041,417- 114,758,410	Perda	q31.2 - q34	4030	127	<i>LINC00433, LINC00353, LINC00559, MIR622, LINC00410, LINC00379, MIR17, MIR18A, MIR19A, MIR20A, MIR17HG, MIR19B1, MIR92A1, GPC5, GPC5-AS1, GPC6, GPC6-AS2, DCT, TGDS, GPR180, SOX21, ABCC4, CLDN10, CLDN10-AS1, DZIP1, DNAJC3, UGGT2, HS6ST3, LINC00359, OXGR1, MBNL2, RAP2A, IPO5, RNF113B, MIR3170, FARP1, STK24, SLC15A1, DOCK9, UBAC2-AS1, GPR18, UBAC2, GPR183, MIR548AN, FKSG29, MIR623, TM9SF2, MIR4306, CLYBL, ZIC5, ZIC2, PCCA, PCCA-AS1, GGACT, TMTC4, NALCN-AS1, NALCN, ITGBL1, MIR2681, MIR4705, FGF14, FGF14-IT1, FGF14-AS2, TPP2, METTL21C, CCDC168, TEX30, KDELC1, BIVM, BIVM-ERCC5, ERCC5, METTL21EP, SLC10A2, MIR548AS, DAOA, DAOA-AS1, LINC00343, LINC00460, EFNB2, ARGLU1, LINC00551, LINC00443, FAM155A, LIG4, ABHD13, TNFSF13B, MYO16, MYO16-AS1, IRS2, COL4A1, COL4A2, COL4A2-AS1, RAB20, CARKD, CARS2, ING1, LINC00346, ANKRD10, ARHGEF7, TEX29, SOX1, SPACA7, TUBGCP3, C13orf35, ATP11A, MCF2L-AS1, MCF2L, F7, F10, PROZ, PCID2, CUL4A, LAMP1, GRTP1, ADPRHL1, DCUN1D2, TMC03, TFDPI, ATP4B, GRK1, LINC00552, TMEM255B, GAS6-AS1, GAS6, LOC100506394, LINC00565, RASA3</i>
1779684	chr15: 20,561,801- 22,341,484	Perda	q11.1 - q11.2	39	12	<i>HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, NBEAP1, POTEb, NF1P2, CT60, LOC646214, CXADRP2, POTEb, NF1P2, LOC727924</i>
407230	chr14: 19,999,034- 20,406,263	Perda	q11.2	26	8	<i>POTEM, OR11H2, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>
365312	chr13: 114,804,567- 115,169,878	Perda	q34	57	4	<i>RASA3, CDC16, UPF3A, CHAMP1</i>
306898	chr16: 34,446,302- 34,753,199	Ganho	p11.2 - p11.1	23	3	<i>LOC283914, LOC146481, LOC100130700</i>
158628	chr8: 39,230,689- 39,389,316	Ganho	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>

5.7 - Investigação Genômica de Paciente com Translocação 1q;11p (caso 7)

O paciente 11 apresentava fenótipo de genitália ambígua e cariótipo 46,XY,t(1;11)(q31;p13).

A técnica de aCGH evidenciou três alterações, todas perdas genômicas. Duas localizadas no cromossomo 8: de 302785bp na região 5,538,804-5,841,588 e de 152688bp, em homozigose, na região 39,230,689-39,383,376. Outra perda em homozigose foi detectada no cromossomo 12, de 72534bp na região 9,631,091-9,703,624.

As alterações encontram-se descritas na Tabela 12.

Tabela 12 - Descrição das alterações encontradas no paciente 11, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Nº Sondas	Nº Genes	Genes
302785	chr8: 5,538,804-5,841,588	Perda	p23.2	19	0	
152688	chr8: 39,230,689-39,383,376	Perda em homozigose	p11.22	27	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
72534	chr12: 9,631,091-9,703,624	Perda em homozigose	p13.31	8	0	

Assim, pôde-se definir o diagnóstico citogenômico do paciente 11 como: arr[hg19] 8p11.22(39,230,689-39,383,376)x0, 8p23.3(5,538,804-5,841,588)x1, 12p13.31(9,631,091-9,703,624).

A técnica de mBand foi realizada para detecção exata dos pontos de quebra cromossômica, confirmando a translocação equilibrada entre o braço longo do cromossomo 1 e o braço curto do cromossomo 11. As imagens foram agrupadas na figura 14.

Figura 12 - mBand do paciente 11, mostrando um rearranjo complexo correspondendo à translocação 1q;11p. **b1)** Cromossomo 1 que, através das curvas das sondas detectadas para o cromossomo 1, revela a ausência da região 1q31.1 → q44. **b2)** Cromossomo 11, de ponta-cabeça, marcado com sonda para o cromossomo 1, revelando presença de parte do cromossomo 1 na região 11p13 → p15.5. **b3)** Cromossomo 1, de ponta-cabeça, marcado com sondas para o cromossomo 11, mostrando a presença de parte do cromossomo 11 na região 1q31.1 → q44. **b4)** Cromossomo 11, marcado com sondas para o cromossomo 11, mostrando a ausência da região 11p13 → p15.5. Kit de sondas mBand para os cromossomos 1 e 11 (24XCyte, Metasystems, EU).

5.8 - Investigação Genômica de Paciente com Material Adicional no Braço Curto do Cromossomo 8 (caso 8)

A paciente 12 apresentava fenótipo principal de atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e cariótipo 46, XX, add8p, inv(9)p13q13.

Foram encontradas cinco alterações, correspondentes a quatro ganhos e uma perda, todas no cromossomo 8. A perda encontrada foi de 3787520bp na região 1,745,033-5,532,552. Os ganhos apresentados foram de 2003469bp na região 31,611,578-33,615,046, de 1891358bp na região 37,636,779-39,528,136, de 1746018bp na região 16,942,351-18,688,368 e de 1527237bp na região 14,385,752-15,912,988.

As alterações detectadas pela técnica de array CGH estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Descrição das alterações encontradas no paciente 3, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (bp)	Região	Evento	Banda	Nº Sondas	Nº Genes	Genes
3787520	chr8:1,745,033-5,532,552	Perda	p23.3 - p23.2	12	5	<i>MIR596, ARHGEF10, KBTBD11, MYOM2, CSMD1</i>
2003469	chr8:31,611,578-33,615,046	Ganho	p12	5	7	<i>NRG1, NRG1-IT3, FUT10, MAK16, TTI2, RNF122, DUSP26</i>
1891358	chr8:37,636,779-39,528,136	Ganho	p11.23 - p11.22	8	28	<i>PROSC, GPR124, BRF2, RAB11FIP1, GOTIL1, ADRB3, EIF4EBP1, ASH2L, STAR, LSM1, BAG4, DDHD2, PPAPDC1B, WHSC1L1, LETM2, FGFR1, C8orf86, RNF5P1, TACC1, PLEKHA2, HTRA4, TM2D2, ADAM9, ADAM32, ADAM5, ADAM3A, LOC100130964, ADAM18</i>
1746018	chr8:16,942,351-18,688,368	Ganho	p22	4	14	<i>EFHA2, ZDHHC2, CNOT7, VPS37A, MTMR7, SLC7A2, PDGFRL, MTUS1, FGL1, PCM1, ASAH1, NAT1, NAT2, PSD3</i>
1527237	chr8:14,385,752-15,912,988	Ganho	p22	3	3	<i>SGCZ, MIR383, TUSC3</i>

Assim, o diagnóstico citogenômico da paciente 12 foi descrito como: arr[hg19]8p11.22p11.23(37,636,779-39,528,136)x3,8p12(31,611,578-33,615,046)x3,8p22(16,942,351-18,688,368)x3,8p22(14,385,752-15,912,988)x3,8p23.2p23.3(1,745,033-5,532,552)x3.

5.9 - Investigação Genômica de Paciente com Cromossomo Marcador Extranumerário (caso 9)

O paciente 13, portador de múltiplas malformações congênitas e cariótipo 47,XY+mar em 100 células, foi analisado pela técnica de aCGH e apresentou oito alterações genômicas, com seis ganhos e duas perdas (com uma perda em homozigose).

Foram encontrados ganhos no cromossomo 22, de 21060608bp na região 16,486,086-18,646,693; no cromossomo 8, de 158628bp na região 39,230,689-39,389,316; no cromossomo 11, de 124390bp na região 46,579,054-46,703,443 e de 76396bp, na região 55,364,925-55,441,320; no cromossomo 12, de 96011bp na região 9,631,091-9,727,101 e no cromossomo X, ganho de 74751bp, na região 11,328,034-11,402,784. As perdas foram encontradas no cromossomo 7, de 147334bp na região 111,053,174-111,200,507 e no cromossomo 15, de 143632bp em homozigose, na região 34,698,452-34,842,083.

As alterações encontradas estão descritas na Tabela 14.

Tabela 14 - Descrição das alterações encontradas no paciente 13, contendo tamanho, localização, classe do evento, quantidade de sondas envolvidas, e os genes mapeados nessas regiões, através da técnica de aCGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA), analisado pelo *software* Nexus 7.0.

Tamanho (pb)	Região	Evento	Banda	Sondas	Nº Genes	Genes
2160608	chr22:16,486,086-18,646,693	Ganho	q11.1 - q11.21	318	25	<i>CCT8L2, TPTEP1, ANKRD62P1-PARP4P3, XKR3, HSFY1P1, GAB4, CECR7, IL17RA, CECR6, CECR5, CECR5-AS1, CECR1, CECR3, CECR2, SLC25A18, ATP6V1E1, BCL2L13, BID, MIR3198-1, MICAL3, MIR648, FLJ41941, PEX26, TUBA8, USP18</i>
158628	chr8:39,230,689-39,389,316	Ganho	p11.22	28	2	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
147334	chr7:111,053,174-111,200,507	Perda	q31.1	26	1	<i>IMMP2L</i>
143632	chr15:34,698,452-34,842,083	Perda em homozigose	q14	13	4	<i>GOLGA8A, MIR1233-1, MIR1233-2, GOLGA8B</i>
124390	chr11:46,579,054-46,703,443	Ganho	p11.2	24	4	<i>AMBRA1, HARB1, ATG13, ARHGAP1</i>
96011	chr12:9,631,091-9,727,101	Ganho	p13.31	11	0	
76396	chr11:55,364,925-55,441,320	Ganho	q11	14	4	<i>OR4C11, OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>
74751	chrX:11,328,034-11,402,784	Ganho	p22.2	17	1	<i>ARHGAP6</i>

Assim, foi delimitado o diagnóstico citogenômico do paciente 13: arr[hg19] Xp22.2(11,328,034-11,402,784)x3,7q31.1(111,053,174-111,200,507)x1,8p11.22(39,230,689-39,389,316)x3,11p11.2(46,579,054-46,703,443)x3,11q11(55,364,925-55,441,320)x3,12p13.31(9,631,091-9,727,101)x3,15q14(34,698,452-34,842,083)x0, 22q11.1q11.21(16,486,086-18,646,693)x3.

Posteriormente, foi realizada técnica de FISH para confirmação de ganho do cromossomo 22, com objetivo de confirmar a origem do cromossomo marcador. Foi utilizada sonda SureFISH Agilent (G100550-85501 Green) para o cromossomo 22, região 17427487-

18040145, que ratificou o resultado do aCGH, confirmando a trissomia da região 22q11(figura 15).

Figura 13 – Resultado da técnica de FISH do paciente 13, utilizando a sonda G100550-85501 verde, evidenciando a trissomia da região chr22q11.1-11.21, pela presença de três sinais verdes.

Discussão

6.0 - DISCUSSÃO

Geralmente, a citogenética clássica é o único teste realizado na investigação clínica, mas possui muitas limitações, dentre elas: o sucesso da cultura celular, a dependência de uma boa morfologia cromossômica, o sucesso da técnica de bandamento e a baixa resolução entre 5 e 10Mb. As técnicas de citogenética molecular, como a FISH, possuem uma eficiência alta, porém é necessário conhecimento da região alvo específica. A técnica de aCGH é uma técnica citogenômica poderosa que garante a varredura de todo o genoma, identificando as regiões em que houve perdas e ganhos, definindo o tamanho e localização específica das mesmas, sem a necessidade de cultura ou de técnicas de fixação celular e oferece maior resolução (Gao *et al.*, 2012).

Alguns resultados obtidos no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (período de 1976 a 1998) e no Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (de 1999 a 2005) - foram reavaliados por técnicas de citogenética clássica, em levantamentos recentes. Dos 8.131 cariótipos, 7.469 foram informativos, correspondendo a 91,85% da amostra. Foram detectadas aneuploidias cromossômicas em 1363 cariótipos (18,25%), aberrações cromossômicas estruturais em 405 cariótipos (5,42%) e 483 cariótipos (6,47%) com variantes da normalidade. No entanto, esses resultados possibilitaram a definição diagnóstica e o aconselhamento genético de apenas 30,14% dos pacientes encaminhados com hipótese diagnóstica de cromossomopatia. Por outro lado, quando foi aplicada a técnica de SKY para caracterização de 17 pacientes com cromossomos extranumerários de origem desconhecida, o diagnóstico foi definido para 71% dos casos (Martelli, 2010).

O diagnóstico preciso é importante para oferecer ao paciente e sua família um aconselhamento genético adequado, fornecendo informações sobre o risco de ocorrência ou recorrência familiar de anomalias genéticas com as finalidades de: (a) ampla compreensão de todas as implicações relacionadas às doenças genéticas em discussão; (b) orientar sobre as opções que a medicina atual oferece para a terapêutica ou para a diminuição dos riscos de ocorrência ou recorrência da doença genética em questão, dando o suporte médico necessário e (c) eventual apoio psicoterapêutico. Assim, o aconselhamento defende o bem-estar de indivíduos e suas famílias, ajudando-os a resolver problemas de natureza genética, tentando esclarecer dúvidas e diminuindo ou evitando sofrimentos e preocupações (Pinto Jr, 2002).

Existe consenso sobre a indicação de microarranjos como teste diagnóstico de primeira linha para avaliação de pacientes com atrasos de desenvolvimento e/ou anomalias congênitas (Park, S.J. *et al.*, 2011). Theisen e colaboradores (2008) demonstraram que a técnica de aCGH permite detecção de 10 a 20% de anormalidades cromossômicas em crianças com atraso no desenvolvimento e anomalias congênitas. Em contrapartida, apenas 3 a 5% dessas anormalidades podem ser detectadas por outras técnicas.

Para selecionar qual plataforma de aCGH é apropriada para um estudo deve-se levar em consideração uma série de fatores, que incluem a necessidade da aplicação, a resolução de dados desejada e o orçamento disponível. Muitos microarranjos pré-definidos estão disponíveis para várias aplicações e espécies. Os microarranjos de alta resolução, como as plataformas de 1x1M ou 2x400k têm sido muito utilizadas em pesquisa. Essas plataformas oferecem maior conteúdo e menor espaçamento entre as sondas, permitindo o exame detalhado de todo o genoma. Os microarranjos de alta resolução são também ideais para a identificação de novas regiões de CNVs. O espaço entre as sondas, nos chips da *Agilent Human Genome CGH Microarrays* é de 2,1 kb, na plataforma 1x1Mb, e de 5,3 kb na de 2x400K (Curtis *et al.*, 2009). CNVs variam de 1kb a vários Mb, e a densidade dos microarranjos influencia na detecção de CNVs pequenos, que podem ser detectados por plataformas de alta densidade, com resolução confiável de 50kb de tamanho (Campbell, 2011).

Considerando essas informações, foi escolhida para este trabalho a plataforma 2x400K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), consistindo em um chip com espaço para aplicação da técnica de aCGH em 2 amostras, simultaneamente. São 411.056 sondas por amostra, com sondas compostas por oligonucleotídeos que cobrem todo o genoma humano.

A técnica de aCGH possui limitações, como a não detecção de poliploidias, translocações equilibradas, inversões e baixo nível de mosaicismo (<30%). Cromossomos marcadores também podem não ser identificados na análise, dependendo do tamanho, da composição e da cobertura do microarranjo para a região cromossômica específica presente no cromossomo marcador. Em alguns casos, são necessárias outras análises citogenéticas convencionais e moleculares para validação da aCGH ou para complementação diagnóstica (Park *et al.*, 2011).

A técnica de aCGH gera um grande número de dados, que devem ser analisados por bioinformática. Para isso, utilizamos o software Nexus Copy Number, desenvolvido pela Biodiscovery, que possui algoritmos eficientes para a análise e visualização de número de cópias e eventos de variação de sequência de aCGH, SNP-array e plataformas NGS, com

integração com bases de dados externas, como o DECIPHER, o ISCA e o OMIM, que permitem associações diversas com os resultados.

Com a análise por aCGH dos 13 pacientes avaliados, foram encontradas 99 alterações, com média aproximada de 8 alterações/paciente. Foram 63 ganhos (6 de alto ganho), e 37 perdas (12 em homozigose). Houve uma média aproximada de 5 ganhos e 3 perdas por amostra. O maior número de alterações encontrados em um paciente foi de 18, e o menor número foram de 2 alterações.

O paciente 1, avaliado por aCGH, apresentou sete alterações. Destas, três foram herdadas. O ganho da região Xp22.33 também foi observado na mãe (paciente 2), e os ganhos da região 16p11.2-p11.1 e da região 12p12.3 foram observados em ambos os genitores (paciente 2 e 3). Os ganhos *de novo* foram observados nas regiões 15q11.1- q11.2, de 2Mb; 8p23.2, de 167kb; 4p16.3, de 40kb; e 16p13.11, de 20kb.

O fenótipo do paciente 1 abrange obesidade e deficiência intelectual, além de dismorfias: pit pré-auricular à direita, braquicefalia, hipertelorismo, fenda palpebral oblíqua para baixo, ponte nasal alargada, orelhas grandes, baqueteamento digital, e alta estatura fora do canal familiar.

A região 15q11.1-q11.2 foi associada com deficiência intelectual por Kashevarova e colaboradores (2013), em estudo citogenômico de CNVs por citogenômica, em nove pacientes. O banco de dados DECIPHER descreve um paciente (#260150), com ganho da região chr15:20602842-22509395, com algumas características em comum ao paciente 1, como deficiência intelectual, atraso motor e deficiência de atenção. O banco de dados ISCA (#nssv578677) descreve a posição chr15:20085002-28947309 (15q11.1-15q13.1), como sendo uma CNV patogênica, responsável por fenótipo de atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas. Com as mesmas características fenotípicas, uma CNV descrita no banco de dados ISCA (#nssv578683), na posição chr15:20207713-30641396 (15q11.1-15q13.2) também foi caracterizada como patogênica.

O DECIPHER apresenta alguns casos com alterações na região 16p11.1-p11.2, relacionadas a autismo (#283459, posição chr16:34466678-34755816 e #283461, na posição chr16:34471297-34765203) e atraso no desenvolvimento da linguagem (#281899, posição chr16:34472017-34744872). O ISCA descreve algumas CNVs na região 16p11.1-p11.2 como patogênicas, responsáveis por atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas, como a descrita na posição chr16:30703233-35147508 (#nssv576714).

Outros casos com alterações na região Xp22.33 descritas no DECIPHER, apresentam fenótipo semelhante ao paciente 1, como o #248654, com ganho na posição chrX:70121-160747, com anormalidades na face, deficiência intelectual e obesidade; #2689 e #2686, com ganho na região chrX:70121-85344, com deficiência intelectual e alta estatura; caso #248733 e #248676 com ganho na posição chrX:70121-85344 este porém com fenótipo de dismorfias faciais, deficiência intelectual, obesidade, ponte nasal proeminente e alta estatura.

As outras alterações encontradas foram consideradas CNVs benignas, provavelmente não relacionadas ao fenótipo do paciente 1.

O resultado do mBand mostrou inversões nos dois cromossomos 12 do paciente 1, definindo o cariótipo 46,XY,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2. Contudo, a análise citogenômica detectou um ganho na região 12p12.3, de 113kb, que não foi correlacionada com seu fenótipo.

Acreditava-se que o paciente 1, com inversão nos dois cromossomos 12, herdado dos pais (paciente 2 e 3), seria diagnosticado com alterações citogenômicas também no cromossomo 12 para justificar o seu fenótipo, contudo, o resultado do aCGH indicou que o fenótipo está provavelmente associado aos ganhos nas regiões 15q11.1-q11.2, 16p11.1-p11.2 e Xp22.33.

Os pacientes 4, 5 e 6 foram avaliados por meio da técnica de aCGH e seus resultados foram posteriormente comparados e associados ao fenótipo familiar de alterações metabólicas. A paciente 4 apresentou dezoito alterações citogenômicas, seu meio-irmão paterno (paciente 5) apresentou quinze alterações e o genitor (paciente 6) apresentou oito alterações. Os meio-irmãos apresentaram cinco alterações em comum, com ganhos na região 8p23.1-p23.3 que envolve os genes *ARHGEF10*, *KBTBD11*, *MYOM2*, *CSMD1*, *LOC100287015*, *MCPH1*, *ANGPT2*, *AGPAT5*, *MIR4659A*, *MIR4659B*, *XKR5*, *LOC100652791*, *DEFB1*, *DEFA6*, *DEFA4*, *DEFA8P*, *DEFA9P*, *DEFA10P*, *DEFA1*, *DEFA1B*, *DEFT1P2*, *DEFT1P*, *DEFA1*, *DEFA1B*, *DEFT1P2*, *DEFT1P*, *DEFA3*, *DEFA1*, *DEFA1B*, *DEFA11P*, *DEFA5*, *LOC349196*, *LOC349196*, *LOC349196*, *DEFB109P1B*, *FAM66B*, *USP17L1P*, *USP17L4*, *ZNF705G*, *DEFB4B*, *DEFB103B*, *DEFB103A*, *SPAG11B*, *DEFB104A*, *DEFB104B*, *DEFB106A*, *DEFB106B*, *DEFB105A*, *DEFB105B*, *DEFB107A*, *DEFB107B*, *FAM90A7P*, *FAM90A7P*, *FAM90A10P*, *DEFB107A*, *DEFB107B*, *DEFB105A*, *DEFB105B*, *DEFB106A*, *DEFB106B*, *DEFB104A*, *DEFB104B*, *SPAG11B*, *SPAG11A*, *DEFB103A*, *DEFB103B*, *DEFB4A*, *ZNF705B*, *USP17L8*, *USP17L3*, *FAM66E*,

DEFB109P1B, *MIR548I3*, *FAM86B3P*, *SGK223*, *CLDN23*, *MFHAS1*, *ERII*, *MIR4660*, *PPP1R3B*, *LOC157273*, *TNKS*, *MIR597*, *LINC00599*, *MIR124-1*, *MSRA*, *PRSS55*, *RP1L1*, *C8orf74*, *SOX7*, *PINX1*, *MIR1322*, *MIR598*, *XKR6*, *MTMR9*, *SLC35G5*, *TDH*, *C8orf12*, *FAM167A*, *BLK*, *LINC00208*, *GATA4*, *NEIL2*, *FDFT1*, *CTSB*, *DEFB136*, *DEFB135*, *DEFB134*, *DEFB130*, *LOC100133267*, *ZNF705D*, *LOC392196*, *USP17L7*, *FAM66D*, *USP17L2*, *FAM90A2P*, *FAM86B1*, *DEFB130*, *LOC100133267*, *LOC649352*, *FAM66A*, *DEFB109P1*, *FAM90A25P*, *FAM86B2*, *LOC100506990*, e *LOC729732*, e na região 12p13.31 envolvendo os genes *SLC2A14* e *SLC2A3*. Foram também observadas duas áreas de perda na região 4p16.3 que envolvem os genes *RNF212*, *TMED11P*, *SPON2*, *LOC100130872*, *CTBP1*, *CTBP1-AS1*, *MAEA*, *FAM193A* e *TNIP2*. A região de ganho na banda 12p13.31 também foi observada no genitor. Além desta, o paciente 6 e a paciente 4 compartilharam mais três alterações: dois ganhos, nas bandas 11q11, envolvendo os genes *OR4C11*, *OR4P4*, e *OR4S2*, e em 8p11.22, envolvendo os genes *ADAM5* e *ADAM3A*, e uma perda na região 4q13.2, envolvendo os genes *UGT2B17*, *UGT2B15*.

O fenótipo da paciente 4 inclui microcefalia e convulsões, com hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, valores alterados de cobre sérico, e proteinúria. As características fenotípicas do paciente 5 são hipotonia ao nascimento, deficiência de crescimento, convulsões e valor aumentado de cobre sérico, mas sem quadro de apresentou dislipidemias ou proteinúria. O pai não apresenta dismorfias, malformações e apresenta capacidade intelectual normal, sendo a hipercolesterolemia o único achado fenotípico descrito.

O banco de dados DECIPHER descreve um caso (#270581) com perda na região 4p16.3, na posição chr4:1988629-2009787, com fenótipo de apraxia, clinodactilia do 5º dedo, deficiência intelectual, implantação baixa das orelhas, macrodontia, microcefalia, fenda labial, orelhas rodadas posteriormente, glabella proeminente e sinofre.

O banco de dados OMIM descreve cinco genes, que estão ligados a algumas doenças, localizados na região 4p16.3, onde foram detectadas perdas de sequências nos pacientes 4 e 5. São eles: gene *NAT8L* (#610647), na posição chr4:2061239-2070816, que pode levar à deficiência de N-acetilaspártato, prejudicando o funcionamento do cérebro; genes *WHS* (#194190), na posição chr4:1-4500000, associados às características da síndrome de Wolf-Hirschhorn, incluindo a face característica e atraso do desenvolvimento; gene *ADD1* (#102680), na posição chr4:2845584-293180, relacionado ao fenótipo de hipertensão; gene *HTT* (#613004), na posição chr4:3076237-3245687, associada à doença de Huntington, que causa neurodegeneração progressiva; e o gene *ADRA2C* (#104250), na posição chr4:3768296-3770253, ligado ao fenótipo de insuficiência cardíaca. Nenhum dos dois

pacientes investigados possui fenótipo compatível com os achados descritos nos bancos de dados para perdas na região 4p16.3.

Heijmans (2005), realizando estudos de ligação por metanálise, investigou 701 gêmeos com dislipidemias e sugeriu uma correlação entre a alteração dos níveis de colesterol HDL e a região cromossômica 8p23.1.

Segundo o banco de dados OMIM (#614796), o gene *AGPAT5* (1-acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferase 5), localizado na região 8p23.1, pode ser correlacionado com o fenótipo de hiperlipidemia. Outro gene de importância metabólica presente na região 8p23.1 é o *FDFT1* (esqualene sintetase), também descrito no OMIM (#184420), e está ligado à biossíntese de colesterol, incluindo a regulação dos níveis de colesterol no plasma celular, responsável pelo fluxo de metabólitos em qualquer das ramificações das vias de esteróis ou não-esteróis. O gene *MCPHI* (Microcefalina), também localizado na região 8p23.1, posição chr8:6264113-6501140, é correlacionado com o fenótipo de microcefalia pelo OMIM (#607117). Estes genes estão localizados em uma região de ganho comum aos paciente 4 e 5, e podem ter expressão aumentada na paciente 4, provocando fenótipo. Outro gene de importância metabólica, na região 8p23.1, é descrito no OMIM (#191305), o *BLK* (não receptor de tirosina kinase). Localizado na posição chr8:11351521-11422108, o *BLK* está associado à diabetes precoce. Baseados nesses achados, recomendamos controle dos índices glicêmicos dos paciente 4 e 5, pois este gene encontra-se numa região em que ambos apresentaram ganho.

O banco de dados DECIPHER, descreve quatro casos com ganhos de sequências em diferentes posições da região 8p23.1, apresentando diferentes fenótipos. São eles: #1617, posição chr8:7169416-7855756, com fenótipo de clinodactilia do 5º dedo, atraso de fala e no desenvolvimento da linguagem, cabelo fino, microcefalia, orelhas proeminentes, afilamento de dedos; #259716, posição chr8:8229907-8648348, com fenótipo de deficiência intelectual, microcefalia e convulsões; #281495, posição chr8:11683633-11841901, com deficiência intelectual moderada e #249495, posição chr8:11367738-12408382, com fenótipo de narinas antevertidas e hipotonia muscular. Dos fenótipos citados, percebe-se que muitos achados são compatíveis com os apresentados pela paciente 4 (microcefalia e convulsões) e pelo paciente 5 (hipotonia e convulsões).

O banco de dados ISCA descreve uma CNV patogênica (#nssv576390), na região 8p23.1, com ganho na posição chr8:7691901-12039974, com fenótipo de deficiência intelectual. Outra CNV (#nssv1603778), localizada na região 8p23.1-p23.2, com ganho na

posição chr8:2433722-6463100, é descrita com fenótipo de deficiência intelectual e alterações morfológicas.

Um caso com ganho na região 8p23.1-p23.2, posição chr8:5897634-6327274, também foi descrito pelo DECIPHER (#249114), com fenótipo de fenda palatina, anormalidade do rim, anormalidade de costelas, anormalidade do dedo polegar, e unhas pequenas.

O banco de dados DECIPHER, descreve quatro casos com ganhos de sequências em diferentes posições da região 8p23.2, apresentando diferentes fenótipos. São eles: #282475, posição chr8:2206188-3754448, caracterizada por autismo, atraso no desenvolvimento global, deficiência intelectual moderada, obesidade, e rosto redondo; #248566, 8p23.2, posição chr8:2366840-3037530, com fenótipo de anormalidade da região periorbitária, alterações em dedos, dermatite atópica, artelhos largos, facies grosseira, olho profundo, cabelo fino, hipoplasia de corpo caloso, deficiência intelectual, pectus excavatum, tempo de atenção curto, cabelos ralos, sobrancelhas grossas e boca larga; #283246, posição chr8:2433724-2832481, com atraso no desenvolvimento global e convulsões; #275284, posição chr8:4767547-5721428, com anormalidade nas funções mentais mais elaboradas e obesidade. Observamos que o fenótipo apresentado pelo caso #283246, caracterizado por atraso no crescimento e convulsões é comum ao paciente 5 de nossa amostra.

O DECIPHER também descreve um caso (#252360) com ganho na região 8p23.3 na posição chr8:224775-288928, com fenótipo de deficiência auditiva e intelectual.

Naumova e colaboradores (2003) estudaram grupos de famílias com hiperlipidemia combinada familiar, sugerindo correlação entre a doença e a região 11p14.1-q12. Neste mesmo trabalho, os autores afirmaram que o cromossomo 8 possuía locos candidatos que poderiam ser responsáveis por alterações nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol.

Shoulders, Jones e Naumova (2004), em outro estudo sobre a etiologia da hiperlipidemia familiar combinada, ratificaram a conclusão de que a presença de genes na região 11p14.1-q12.1 contribui para um perfil lipídico inadequado.

Jarick e colaboradores (2011), descreveram uma área comum de CNVs na região 11q11, cobrindo os três genes receptores olfativos *OR4P4*, *OR4S2* e *OR4C6*, associada com obesidade, a mesma região identificada nos pacientes 4 e 6.

O gene *SLC2A14*, mapeado na região 12p13.31, é descrito no OMIM (#611039), com importância metabólica. Membro da família de *GLUT* (transportadores de glicose), este gene é responsável por proteínas de membrana integrais altamente conservadas, que

transportam hexoses, como glicose e frutose, em todas as células de mamíferos. Este gene está presente na região de ganho comum nos pacientes 4, 5 e 6.

A partir das informações dos bancos de dados consultados e das alterações encontradas pela técnica de aCGH e do cariótipo, podemos inferir que as alterações encontradas nos cromossomos 8 e 11 foram de grande importância para a determinação do fenótipo dos pacientes 4, 5 e 6. Contudo, os quadros de valores alterados de cobre sérico e de proteinúria não foram justificados pelas alterações genômicas encontradas.

Os cromossomos em anel são achados citogenéticos incomuns, frequentemente associados com características clínicas que se sobrepõem ao fenótipo de pacientes com deleções terminais do cromossomo correspondente. Cerca de 99% de todos os cromossomos em anel surgem esporadicamente. O cromossomo 11 em anel é raramente observado e poucos pacientes foram relatados na literatura, todos com alterações fenotípicas (Hansson *et al.*, 2012), como o paciente 7 da amostra estudada.

O fenótipo do paciente 7 abrange atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, hiperatividade, movimentos involuntários, alteração de comportamento, obesidade, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, dismorfias (microcefalia, estreitamento frontal, achatamento occipital, nariz curto com narinas antevertidas, boca pequena e em carpa, orelhas não displásicas, prega palmar única, pescoço curto e baixa implantação de cabelos), ausculta cardíaca com sopro sistólico ++/6+, clinodactilia de 5º quirodáctilo, pré púbere, pênis curvo com chordee e testículos tópicos.

A análise genômica do paciente 7 apresentou sete alterações, com quatro perdas (duas em homozigose) e três ganhos.

Como esperado pela observação do cariótipo, houve uma deleção na região 11qter (11q24.2-q25), de 8,6Mb, envolvendo 40 genes (*KIRREL3*, *KIRREL3-AS2*, *MIR3167*, *KIRREL3-AS3*, *ETS1*, *FLI1-AS1*, *FLI1*, *KCNJ1*, *C11orf45*, *KCNJ5*, *TP53AIP1*, *ARHGAP32*, *BARX2*, *TMEM45B*, *NFRKB*, *PRDM10*, *LINC00167*, *APLP2*, *ST14*, *ZBTB44*, *ADAMTS8*, *ADAMTS15*, *C11orf44*, *SNX19*, *NTM*, *OPCML*, *SPATA19*, *MIR4697*, *LOC283174*, *IGSF9B*, *LOC100128239*, *JAM3*, *NCAPD3*, *VPS26B*, *THYN1*, *ACAD8*, *GLB1L3*, *GLB1L2*, *B3GAT1*, *LOC283177*). Foi então realizada a técnica de FISH para confirmação da deleção desta região, que validou o diagnóstico (figuras 13 e 14), gerando o resultado: 46, XY.ish del(11)(q25qtel)(G100333R, G100071G-). Como não detectamos deleção na região 11p, sugerimos que o anel foi formado por fusão entre as regiões 11q24.2 e 11ptel.

A deleção da região 11qter é associada à síndrome de Jacobsen (JBS), caracterizada por deficiência intelectual e múltiplos defeitos congênitos (OMIM#147791). A JBS é uma síndrome rara, com expressão fenotípica variável, dependendo dos pontos de interrupção e do tamanho da deleção 11q. Os achados clínicos típicos incluem baixa estatura, dismorfismo facial (hipertelorismo ocular, ponte nasal larga, fendas palpebrais inclinadas para baixo, boca em forma de V, lábio superior fino e orelhas com baixa implantação). Defeitos cardíacos graves estão presentes em 56% dos casos, malformações de rins em 13%, problemas do trato gastrointestinal em 18%, genitália anormal em 36%, alterações de sistema nervoso central em 65% e displasias esqueléticas em 14% dos casos (Diersé *et al.*, 2012). Esta síndrome afeta o cérebro e a medula espinhal, levando ao atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e a problemas de comportamento, como: déficit de atenção, distração, compulsão e hiperatividade. Levando-se em consideração o fenótipo e os resultados da aCGH, concluímos que o paciente preenche os critérios para diagnóstico de síndrome de Jacobsen.

O ISCA (#nssv583833), classifica a região 11q24.2-11q25, posição chr11:124075932-134868420, como patogênica, podendo gerar fenótipos como atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas. Outra CNV (ISCA#nssv577364), presente na posição chr11:127474555-134868348, pode causar déficit de crescimento.

A instabilidade e as alterações do cromossomo 11 podem justificar o quadro de obesidade, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial apresentados, já que o cromossomo 11 possui vários locos, distribuídos por toda a sua extensão, de genes relacionados à obesidade (Rankinen *et al.*, 2006).

Dados da literatura relacionam a duplicação da região chr15:20,102,541-22,667,640, na banda 15q11.1-11.2, com alterações neurológicas como atraso no desenvolvimento e fala, autismo, entre outras (Burnside *et al.*, 2011).

A deleção na região chr6:32,495,182-32,534,876, banda 6p21.32, foi associada à esclerose múltipla (Ferlini *et al.*, 2010). A região 11p15.1, que encontra-se duplicada no paciente 7, contém o gene *AP2A2*, que codifica a proteína AP2A2 (Algar *et al.*, 2007). Doenças associadas à *AP2A2* incluem a síndrome de Wolff-Parkinson-White e gota, o que nos leva a crer que a região duplicada não esteja influenciando no fenótipo do paciente, mesmo porque a região possui um grande cluster de genes imprintados e, quando desregulados, podem levar à síndrome do crescimento excessivo, predisposição a tumor, e à síndrome de Beckwith-Wiedemann (Smith *et al.*, 2007).

A hipertensão de início precoce, associada ao gene *KCNJ5*, responsável por codificar os canais cardíacos de potássio, pode ser encontrada na JBS (Artman *et al.*, 2005). No

entanto, o fenótipo do paciente 7 não inclui trombocitopenia (relacionada aos genes *FLI-1*, *ETS-1* e *NFRK3*) ou anomalias renais (relacionadas aos genes *KCNJ1* e *ADAMTS15*). Nalbantoglu e colaboradores (2013) relataram caso de JBS com ausência de trombocitopenia.

Consideramos que algumas características fenotípicas descritas na JBS não podem ser explicadas simplesmente pela monossomia de genes individuais, mas sim pela combinação de genes contíguos e interações gênicas.

O paciente 8, com cariótipo 46,XY,add(12)(p13), revelou duas alterações na aCGH, correspondentes a dois ganhos: uma duplicação de 38kb, na região 11q11, envolvendo 2 genes (*OR4P4* e *OR4S2*), e outra de 21Mb, na região 12p11.21-p13.3, envolvendo 168 genes: *CD69*, *KLRF1*, *CLEC2B*, *KLRF2*, *CLEC2A*, *CLEC12A*, *CLEC1B*, *CLEC12B*, *CLEC9A*, *CLEC1A*, *CLEC7A*, *OLR1*, *TMEM52B*, *GABARAPL1*, *KLRD1*, *KLRK1*, *KLRC4-KLRK1*, *KLRC4*, *KLRC3*, *KLRC2*, *KLRC1*, *KLRAP1*, *MAGOHB*, *STYK1*, *CSDA*, *TAS2R7*, *TAS2R8*, *TAS2R9*, *TAS2R10*, *PRR4*, *PRH1*, *TAS2R13*, *PRH2*, *TAS2R14*, *TAS2R50*, *TAS2R20*, *PRH1-PRR4*, *TAS2R19*, *TAS2R31*, *TAS2R46*, *TAS2R43*, *TAS2R30*, *LOC100129361*, *TAS2R42*, *PRB3*, *PRB4*, *PRB1*, *PRB2*, *LOC338817*, *ETV6*, *RNU6-19*, *BCL2L14*, *MIR1244-1*, *MIR1244-2*, *MIR1244-3*, *LRP6*, *MANSC1*, *LOH12CR2*, *LOH12CR1*, *DUSP16*, *CREBL2*, *GPR19*, *CDKN1B*, *APOLD1*, *MIR613*, *DDX47*, *RPL13AP20*, *GPRC5A*, *MIR614*, *GPRC5D*, *LOC100506314*, *HEBP1*, *HTR7P1*, *KIAA1467*, *GSG1*, *EMP1*, *C12orf36*, *GRIN2B*, *ATF7IP*, *PLBD1*, *GUCY2C*, *HIST4H4*, *H2AFJ*, *WBP11*, *C12orf69*, *C12orf60*, *ART4*, *MGP*, *ERP27*, *ARHGDIB*, *PDE6H*, *RERG*, *PTPRO*, *EPS8*, *STRAP*, *DERA*, *SLC15A5*, *MGST1*, *LMO3*, *SKP1P2*, *MIR3974*, *RERGL*, *PIK3C2G*, *PLCZ1*, *CAPZA3*, *PLEKHA5*, *AEBP2*, *LOC100506393*, *PDE3A*, *SLCO1C1*, *SLCO1B3*, *SLCO1B7*, *SLCO1B1*, *SLCO1A2*, *IAPP*, *PYROXD1*, *RECQL*, *GOLT1B*, *C12orf39*, *GYS2*, *LDHB*, *KCNJ8*, *ABCC9*, *CMAS*, *ST8SIA1*, *C2CD5*, *ETNK1*, *SOX5*, *MIR920*, *LINC00477*, *BCAT1*, *C12orf77*, *LRMP*, *CASC1*, *LYRM5*, *KRAS*, *IFLTD1*, *MIR4302*, *LOC100506451*, *RASSF8*, *BHLHE41*, *SSPN*, *ITPR2*, *ASUN*, *FGFR1OP2*, *TM7SF3*, *MED21*, *C12orf71*, *STK38L*, *ARNTL2*, *C12orf70*, *PPFIBP1*, *REP15*, *MRPS35*, *MANSC4*, *KLHDC5*, *PTHLH*, *CCDC91*, *FAR2*, *ERGIC2*, *LOC101055625*, *OVCH1*, *TMTC1*, *IPO8*, *CAPRIN2*, *LOC100287314*, *TSPAN11* e *DDX11-AS1*.

O fenótipo do paciente 8 abrange atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (hiperatividade, déficit de atenção, imaturidade e isolamento social), palato em ogiva, e testículos equitópicos em canal inguinal.

Como observado no cariótipo do paciente 8, a presença de material adicional na região 12p13 foi confirmada por aCGH. Provavelmente houve uma duplicação que gerou a

trissomia da região 12p11.21-p13.3 e consequentemente um quadro fenotípico compatível com a síndrome de Pallister-Killian.

A Síndrome de Pallister-Killian (PKS) é uma condição genética rara, multissistêmica, caracterizada por anomalias faciais, atraso variável no desenvolvimento e deficiência intelectual, hipotonia, perda de audição, convulsões, alterações pigmentares na pele, alopecia temporal, hérnia diafragmática, defeitos cardíacos congênitos e outras anormalidades. O quadro clínico deve-se à tetrassomia da região 12p, geralmente com presença de isocromossomo 12p supranumerário, em mosaicismo. Contudo, o fenótipo da PKS também é observado em pacientes com duplicação da região 12p, seja por duplicação intersticial ou por translocação não equilibrada. A maioria dos casos com duplicação parcial 12p envolvendo a região 12p13.31 manifesta fenótipo característico de PKS, levando a crer que esta é uma área crítica para a patogênese referente ao ganho da região 12p (Izumi *et al.*, 2012).

Em consulta aos bancos de dados DECIPHER foram encontrados registros de casos com fenótipo de autismo, deficiência intelectual, microcefalia, e déficit de atenção, associados com ganho na região chr12:10532302-14468952 (#274364). Outro paciente (#268125) apresentou ganho na região chr12:17375514-18680562, banda 12p12.3, com fenótipo de atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem, deficiência intelectual e obesidade. Também há relato de um caso com ganho na região 12p13.1 na posição chr12:14315789-14523568 (#249996) com fenótipo de hipertelorismo, deficiência intelectual, hipotonia muscular e convulsões. O ISCA descreve várias CNVs patogênicas na região alterada, como a #nssv578621 na banda 12p12.1-12p12.3, posição chr12:18405019-25849192, podendo gerar fenótipo caracterizado por atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas.

Bremer e colaboradores (2011), relacionaram os genes *NTF3*, *TMEM16B*, na região, 12p13.31, com CNVs raras ligadas ao fenótipo de autismo.

A alteração encontrada na região 11q11, envolvendo os genes *OR4P4* e *OR4S2*, não foi relacionada ao fenótipo do paciente (Refseq, 2014). Concluímos que o ganho da região 12p11.21-p13.31 foi a alteração de maior importância, sendo determinante para o fenótipo do paciente 8.

Concluindo, o resultado citogenômico do paciente 8, que apresentava um material adicional na região 12pter, determinou ganho da região 12p11.21-p13.31, que é associado à síndrome de Pallister-Killian, compatível com seu fenótipo.

A paciente 9 (47,XX,+mar), apresentou duas alterações visualizadas pela técnica de aCGH, um ganho de 240kb, na banda 4q13.2, envolvendo os genes *TMPRSS11E*, *UGT2B17* e *UGT2B15*, e uma deleção de 142kb, na região 22q11.23-q12.1, envolvendo os genes *LRP5L* e *CRYBB2P1*.

O fenótipo da paciente 9 abrange atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, baixa estatura, microcefalia, dismorfias faciais, lábio inferior fino, frouxidão ligamentar, cardiopatia e cifoescoliose importante.

A deleção da região cromossômica 22q11 é a deleção intersticial conhecida mais freqüente na população, com uma incidência de 1 a cada 4.000 nascidos vivos. Embora as estimativas publicadas variem, é provável que 5-10% dessas deleções sejam herdadas. Esta perda tem sido relatada, com associação maior que 80%, a defeitos congênitos diferentes e malformações que ocorrem com variações e graus de severidade diferentes. Vários estudos têm relatado um aumento na incidência da doença psicótica (esquizofrenia ou transtorno bipolar) em adolescentes e adultos com a deleção 22q11. A principal causa de morbidade e mortalidade nesta doença está relacionada ao defeito cardíaco congênito, afetando 75% dos pacientes. A maioria dos pacientes apresenta uma deleção intersticial de aproximadamente 3Mb (Scambler, 2000), tamanho muito maior do que o encontrado na paciente 9 de nossa amostra, de 142kb. No entanto, a deleção justificaria o quadro de cardiopatia e dismorfias apresentados.

Hillier e colaboradores (2005) demonstraram que, apesar de duplicações intracromossômicas serem relativamente raras no cromossomo 4, um largo cluster em repetição (750kb) de duplicação intracromossômica foi detectado na região 4q13.2. Esta região contém pelo menos cinco membros da família de duplicação de genes em tandem microsomais da UDP-glycosyltransferase, importantes para desintoxicação de drogas. Apesar disso, o fenótipo da paciente não revela alteração por intoxicações no organismo. Além deste estudo, Arcos-Burgos e colaboradores (Arcos-Burgos *et al.*, 2004) encontraram evidências de ligação entre marcadores na região 4q13.2 e famílias com histórico de distúrbio de atenção. O DECIPHER descreve um paciente (#1617) com alteração na região 4q13.2, na posição chr4:69297702-69467710, com fenótipo de atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem. Levando estes achados em consideração, relacionamos o ganho na região 4q13.2 com o fenótipo de déficit intelectual da paciente.

No caso da paciente 9, a técnica de aCGH não foi elucidativo sobre a origem do material adicional acêntrico encontrado, pois esperava-se um ganho em escala de Mb. Provavelmente este material foi gerado por uma quebra cromossômica, caracterizando-se

como um rearranjo equilibrado, mas que pode ter afetado o fenótipo da paciente pelo mecanismo de disrupção gênica ou pela expressão alterada de genes em torno da região do ponto de interrupção.

A análise do aCGH do paciente 10 revelou seis alterações genômicas, com uma grande deleção, de 25,7Mb, na região 13q31.2-q34, envolvendo 127 genes: *LINC00433*, *LINC00353*, *LINC00559*, *MIR622*, *LINC00410*, *LINC00379*, *MIR17*, *MIR18A*, *MIR19A*, *MIR20A*, *MIR17HG*, *MIR19B1*, *MIR92A1*, *GPC5*, *GPC5-AS1*, *GPC6*, *GPC6-AS2*, *DCT*, *TGDS*, *GPR180*, *SOX21*, *ABCC4*, *CLDN10*, *CLDN10-AS1*, *DZIP1*, *DNAJC3*, *UGGT2*, *HS6ST3*, *LINC00359*, *OXGR1*, *MBNL2*, *RAP2A*, *IPO5*, *RNF113B*, *MIR3170*, *FARP1*, *STK24*, *SLC15A1*, *DOCK9*, *UBAC2-AS1*, *GPR18*, *UBAC2*, *GPR183*, *MIR548AN*, *FKSG29*, *MIR623*, *TM9SF2*, *MIR4306*, *CLYBL*, *ZIC5*, *ZIC2*, *PCCA*, *PCCA-AS1*, *GGACT*, *TMTC4*, *NALCN-AS1*, *NALCN*, *ITGBL1*, *MIR2681*, *MIR4705*, *FGF14*, *FGF14-IT1*, *FGF14-AS2*, *TPP2*, *METTL21C*, *CCDC168*, *TEX30*, *KDELC1*, *BIVM*, *BIVM-ERCC5*, *ERCC5*, *METTL21EP*, *SLC10A2*, *MIR548AS*, *DAOA*, *DAOA-AS1*, *LINC00343*, *LINC00460*, *EFNB2*, *ARGLU1*, *LINC00551*, *LINC00443*, *FAM155A*, *LIG4*, *ABHD13*, *TNFSF13B*, *MYO16*, *MYO16-AS1*, *IRS2*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A2-AS1*, *RAB20*, *CARKD*, *CARS2*, *ING1*, *LINC00346*, *ANKRD10*, *ARHGEF7*, *TEX29*, *SOX1*, *SPACA7*, *TUBGCP3*, *C13orf35*, *ATP11A*, *MCF2L-AS1*, *MCF2L*, *F7*, *F10*, *PROZ*, *PCID2*, *CUL4A*, *LAMP1*, *GRTPI*, *ADPRHL1*, *DCUN1D2*, *TMCO3*, *TFDP1*, *ATP4B*, *GRK1*, *LINC00552*, *TMEM255B*, *GAS6-AS1*, *GAS6*, *LOC100506394*, *LINC00565* e *RASA3*. Outra deleção no cromossomo 13, de 365Kb, foi encontrada na banda 13q34, e afetando quatro genes: *RASA3*, *CDC16*, *UPF3A* e *CHAMP1*. Também foram registradas perdas na região 15q11.1-q11.2, de 1,7Mb, afetando doze genes (*HERC2P3*, *GOLGA6L6*, *GOLGA8CP*, *NBEAP1*, *POTEB*, *NF1P2*, *CT60*, *LOC646214*, *CXADRP2*, *POTEB*, *NF1P2*, *LOC727924*), e na região 14q11.2, de 407kb, envolvendo oito genes (*POTEM*, *OR11H2*, *OR4Q3*, *OR4M1*, *OR4N2*, *OR4K2*, *OR4K5*, *OR4K1*). Houve ganho de 306kb, na região 16p11.1-p11.2, envolvendo três genes (*LOC283914*, *LOC146481*, *LOC100130700*) e um outro ganho na região 8p11.2, de 158kb, envolvendo os genes *ADAM5* e *ADAM3A*.

O fenótipo do paciente 10 abrange macrocefalia, fontanela ampla, abaulamento occipital, ausência de 1º quirodáctilo, 1º pododáctilo adulto e pés equinovaros, crises convulsivas, acentuada hidrocefalia com redução volumétrica cerebral, pequena lesão parietal à esquerda, holoprosencefalia semilobar, agenesia de corpo caloso, sinais de cranioestenose das suturas sagitais com braquicefalia, perda auditiva bilateral profunda, coloboma em ambos

os olhos e genitália ambígua com genitália externa com hipertrofia de grandes e pequenos lábios e do tubérculo genital, mas sem útero ou ovários.

Valdes-Miranda e colaboradores (2014), relataram que as microdeleções na região 13q levam a uma aparência facial característica e acometimento sistêmico, com fenótipo variando de acordo com a localização e tamanho da região deletada. As principais características clínicas são deficiência mental, atraso no crescimento, dismorfia craniofacial e vários defeitos congênitos. Pacientes com síndrome de deleção 13q também podem apresentar malformações digitais, fenótipo relacionado à deleção do gene *aGPC5*.

Segundo o banco de dados OMIM, a deleção do gene *MIR17HG* (#609415), presente na região 13q31.2-q34, resulta na síndrome de Feingold 2 (FGLDS2), que é caracterizada por microcefalia, baixa estatura, braquidactilia, braquimesofalangia do segundo e quinto dedos, hipoplasia de severidade variável, sindactilia dos dedos e deficiência intelectual leve. O banco de dados GeneReviews, mostra o gene *ZIC2*, na banda 13q32.3, na posição chr13:100634026-100639019, como fator responsável pela holoprosencefalia (#63050). Esta alteração também é descrita no OMIM (#603073).

O banco de dados ISCA caracteriza várias perdas na região 13q como CNVs patogênicas. São elas: #nssv577433, região 13q32.1-31.3, posição chr13:94223902-98081219; #nssv577443, região 13q33.2-q34, posição chr13:106696069-111018573; #nssv1494965, região 13q32.1-q33.3, posição chr13:97866125-109815264 e #nssv577427, banda 13q31.1-q34, posição chr13:83155143-115092648, com fenótipo de atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas; #nssv1602599, banda 13q33.1-q33.2, na posição chr13:101747941-105726899 e #nssv577431, banda 13q31.3-q32.1, posição chr13:90201764-97310088 com fenótipo de convulsões e atraso de desenvolvimento global; #nssv582646, banda 13q31.3-q33.3, posição chr13:93997311-110110501, com fenótipo de esotropia e retardo do desenvolvimento global; e #nssv706325, banda 13q11-13q34, região chr13:19020001-115092648, com fenótipo de convulsões.

O banco de dados DECIPHER descreve 14 casos com perdas na região 13q31.2-q34, com uma variedade de fenótipos. São eles: #265756, com alteração na região 13q31.2-q31.3, na posição chr13:89212725-94493948, com um fenótipo de anormalidade nos lábios e no sistema esquelético, retardo de crescimento intrauterino, baixa estatura, região palmar e falanges curtas; #270910, com alteração na posição chr13:89366200-92746890, banda 13q31.2-q31.3, com fenótipo de anormalidades no sistema genital, atresia de coanas, holoprosencefalia e retardo de crescimento intrauterino; #281979, com alteração na banda 13q31.3-q32.1 na posição chr13:90550491-96825884, com fenótipo de atraso global de

desenvolvimento; #253794, com alteração na banda 13q31.2-q31.3 na posição chr13:89795910-92065860, com fenótipo de atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem, epicanto, hiperatividade, hipertelorismo, implantação baixa das orelhas, malformação do coração e dos grandes vasos, microcefalia, ptose palpebral e tempo de atenção curto; #248412, com alteração da região 13q31.3 na posição chr13:91918798-92094974, com fenótipo de anormalidade dos membros inferiores, aplasia/hipoplasia do polegar, dificuldades de alimentação na infância, microcefalia, baixa estatura, rosto redondo, ondulação sacral, artelhos curtos, unhas pequenas e sindactilia de artelhos; #283969, com fenótipo de baixa estatura e deficiência intelectual moderada, com alteração na região 13q31.3 na posição chr13:92065660-92277534; #270910, com alteração na região 13q31.3-q33.2 na posição chr13:93465435-106112685, com fenótipo de anormalidades no sistema genital, atresia de coanas, holoprosencefalia e retardo de crescimento intrauterino; #282279, com alteração na banda 13q34 na posição chr13:113562990-114297256, com fenótipo de retardo do desenvolvimento global, microcefalia, convulsões, tetraplegia espástica e boca larga; #253934, com alteração na banda 13q34 na posição chr13:110800326-110818101, com fenótipo de anormalidade do pavilhão auricular, anomalia sacral, atresia anal, blefarofimose, pescoço largo, fenda palatina, ponte nasal deprimida, edema, hidrocefalia, hipertelorismo, hipoplasia do coração, hipospádia, baixa implantação das orelhas, micrognatia, hipoplasia renal e costelas supranumerárias; #268639, com alteração na banda 13q34 na posição chr13:110710932-113989100, com fenótipo de assimetria da mandíbula, anormalidade comportamental/psiquiátrica, deficiência intelectual, cílios longos e fenda palpebral longa; #631, com alteração na banda 13q32.3-q33.1 na posição chr13:101515431-102709370, com fenótipo de deficiência auditiva, hipoplasia do corpo caloso, deficiência intelectual e estatura alta; #249233, com alteração na banda 13q33.3 - 13q34 na posição chr13:108279754-115105806, com fenótipo de anormalidade do lóbulo da orelha, alterações de pele, ponte nasal deprimida, deficiência intelectual, macrotia, microcefalia, escoliose, e talus vertical; #250838, com alteração na banda 13q33.3-q34 na posição chr13:107729432-115085141, com fenótipo de dermatite atópica, atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem, diabetes mellitus, deficiência intelectual, microcefalia e deficiência visual; #280995, com alteração na banda 13q33.1-q33.3 na posição chr13:102864674-109548530, com fenótipo de convulsões, anormalidade comportamental/psiquiátrica e deficiência intelectual moderada.

Dois casos com perdas na região 15q11.1-q11.2, também foram descritos no DECIPHER: caso #1617, com fenótipo de clinodactilia do quinto dedo, atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem, cabelo fino, microcefalia, orelhas proeminentes e

dedos cônicos; e o caso #276223, com fenótipo de anormalidade nos olhos, na face e na região frontal, atraso no desenvolvimento global, alterações nos pés, estrabismo e hérnia umbilical.

Também foi descrito no DECIPHER um caso (#281899) com ganho na região 16p11.1-p11.2, na posição chr16:34472017-34744872, com fenótipo de convulsões e atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem.

Levando em consideração os resultados encontrados por aCGH, compatíveis com o cariótipo observado e os achados na literatura, consideramos que as alterações nas regiões 13q31.2-q34, 15q11.1-q11.2 e 16p11.1-p11.2 tiveram influência sobre o fenótipo do paciente 10. As outras alterações encontradas não possuem casos com fenótipo descrito nos bancos de dados *online* ou na literatura, contudo possuem uma região em comum com CNVs grandes patogênicas (Genomebrowser, 2014).

O paciente 11, com cariótipo 46,XY,t(1q;11p), apresentou três alterações detectadas na técnica de aCGH. Foram descritas três deleções: de 302kb, na região 8p23.2; de 152kb, em homozigose, na região 8p11.2 (envolvendo os genes *ADAM5* e *ADAM3A*); e outra de 72kb, também em homozigose, na região 12p13.31.

O fenótipo do paciente abrange genitália ambígua, caracterizada por criptorquidia bilateral, com testículo esquerdo palpável no canal inguinal, e hipospádia peno-escrotal, com bolsa escrotal hipoplásica, hiperpigmentada e enrugada.

O mBand do paciente 11 confirmou o quadro de rearranjo complexo, com translocação 1q;11p, onde a região 1q31.1-q44 foi translocada com a região 11p13-p15. Sendo assim, o diagnóstico citogenético pôde ser refinado, com determinação dos pontos de quebra e cariótipo 46,XY,t(1;11)(q31.1;p13).

O banco de dados OMIM, não descreve informações sobre o gene *ADAM5*. Sobre o gene *ADAM3A*(#601533), descreve alteração no esperma, com importância para fertilidade.

Consideramos que os resultados da avaliação por aCGH do paciente 11 não foram elucidativos para correlação fenotípica do paciente. Provavelmente, apesar da translocação complexa 1q;11p ser equilibrada, pode ter ocorrido uma disrupção gênica geradora de fenótipo.

Após avaliação por aCGH da paciente 12, foram encontradas cinco alterações, sendo uma perda e quatro ganhos, todos no cromossomo 8. A perda, de 3,7Mb, foi identificada na

região 8p23.2-p23.3 envolvendo os genes *MIR596*, *ARHGEF10*, *KBTBD11*, *MYOM2* e *CSMD1*. Os ganhos foram de 2Mb, na região 8p12 envolvendo os genes *NRG1*, *NRG1-IT3*, *FUT10*, *MAK16*, *TTI2*, *RNF122* e *DUSP26*, de 1,8Mb, na região 8p11.22 - p11.23 envolvendo os genes *PROSC*, *GPR124*, *BRF2*, *RAB11FIP1*, *GOT1L1*, *ADRB3*, *EIF4EBP1*, *ASH2L*, *STAR*, *LSM1*, *BAG4*, *DDHD2*, *PPAPDC1B*, *WHSC1L1*, *LETM2*, *FGFR1*, *C8orf86*, *RNF5P1*, *TACCI*, *PLEKHA2*, *HTRA4*, *TM2D2*, *ADAM9*, *ADAM32*, *ADAM5*, *ADAM3A*, *LOC100130964* e *ADAM18*; um ganho de 1,7Mb e outro de 1,5 Mb na região 8p22 envolvendo os genes *EFHA2*, *ZDHHC2*, *CNOT7*, *VPS37A*, *MTMR7*, *SLC7A2*, *PDGFRL*, *MTUS1*, *FGL1*, *PCMI*, *ASAH1*, *NAT1*, *NAT2*, *PSD3*, *SGCZ*, *MIR383* e *TUSC3*.

O fenótipo da paciente 12 abrange encurtamento de 5° quirodáctilos bilateral, crânio turricefálico, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, agenesia de corpo caloso, hipoplasia de vermis cerebelar e do hemisfério cerebelar esquerdo (variante Dandy Walker), dismorfias (macrocefalia, apagamento supraorbitário, frontal baixo com hipertricrose, nariz pequeno, narinas antevertidas, boca pequena, cútis marmorata e fenda palpebral oblíqua para cima), déficit funcional do rim esquerdo de grau discreto, associado à acentuada hidronefrose, com obstrução urinária.

Segundo Mahjoubi e colaboradores (2005), a trissomia do braço curto do cromossomo 8, *de novo* ou herdada, está associada a defeitos craniofaciais, dobras cutâneas redundantes, deficiência intelectual, agenesia do corpo caloso e múltiplas anormalidades esqueléticas menores. O fenótipo depende do tamanho e região do material genético duplicado. Além disso, um número considerável de rearranjos cromossômicos na região 8p resultaram de acontecimentos *de novo*.

Outros fenótipos também estão associados com o ganho na região 8p, como: hipotonia congênita, dificuldades de alimentação no período neonatal, com atraso de desenvolvimento significativo, fronte proeminente, palato alto, boca grande com lábio superior fino, orelhas mal formadas, ponte nasal larga, anomalias dentárias e frouxidão articular. Aparentemente, o fenótipo é mais grave quando a duplicação envolve um segmento mais longo e mais proximal. Duplicações na região 8p11.2-p23 envolvem fenótipos como deficiência mental grave, alterações faciais menores, agenesia do corpo caloso, hipotonia, alterações ortopédicas, escoliose/cifose e, em cerca de 26% dos casos, cardiopatia congênita. Pacientes com ganhos na região 8p22-pter apresentaram fenótipo leve, como dificuldade de aprendizagem. A banda 8p23 contém um gene ou genes que são considerados fundamentais para o desenvolvimento e função cardíaca normal. Sugere-se que a existência de genes na região 8p seja decisiva para o desenvolvimento do cérebro e do coração (Marafie *et al.*, 2007).

O OMIM (#614426) associa o gene *TTI2*, localizado na banda 8p12, posição chr8:33356027-33370703, com o fenótipo de deficiência intelectual. Um caso de ganho na região 8p12, na posição chr8:33186627-33419719 foi descrito no DECIPHER (#280597), com fenótipo de atraso global de desenvolvimento.

Dez casos com ganhos na região 8p22 foram descritos no DECIPHER com grande variedade fenotípica. São eles: #268599, com alteração na posição chr8:17246538-18165044 e fenótipo de autismo, defeito no septo interatrial, ectopia do cristalino, deficiência intelectual e refluxo vesicoureteral; #249407, com alteração na posição chr8:17540932-18100755 e fenótipo de anormalidade cardíaca e coartação da aorta; #250561, com alteração na posição chr8:17632076-17800896 e fenótipo de sindactilia entre 2°-3° artelhos, anormalidades do ouvido externo, narinas antevertidas, dermatite atópica e pescoço curto; #251072, com alteração na posição chr8:17963855-18101268, com fenótipo de deficiência auditiva, deficiência intelectual, miopia, baixa estatura proporcional e pé torto; #277609, com alteração na posição chr8:18034689-18142916 e fenótipo de alteração de comportamento, torcicolo congênito, cantos da boca voltada para baixo, hipotonia global, atraso no desenvolvimento, frouxidão ligamentar, plagiocefalia, além de comportamento restritivo e estereotipado; #268599, com alteração na posição chr8:17246538-18165044 e fenótipo de autismo, defeito no septo interatrial, ectopia do cristalino, deficiência intelectual e refluxo vesicoureteral; #282149, com alteração na posição chr8:14498658-14647419, fenótipo de autismo e deficiência intelectual moderada; #258153, com alteração na posição chr8:17038335-17183650 e #272067, com alteração na posição chr8:17093833-17519105, com fenótipo de deficiência intelectual.

O OMIM descreve dois genes associados à doenças na região 8p22, o gene *VPS37A* (#609927), localizado na posição chr8:17104401-17155533, associado ao fenótipo de paraplegia espástica, e o gene *TUSC3* (#601385), localizado na posição chr8:15397596-15624158, associado ao fenótipo de deficiência intelectual. Contudo, o fenótipo de paraplegia espástica não foi expresso na paciente 12 de nossa amostra.

Em relação a perdas genômicas, quatro casos estão descritos no DECIPHER, com perdas diversas na região 8p23.2-p23.3 e diferentes fenótipos. São eles: #281204, com alteração na banda 8p23.2-p23.3, na posição chr8:2133991-3122067 e #280996, com alteração na banda 8p23.2, na posição chr8:2832422-2966437, ambos com fenótipo de deficiência intelectual moderada; #268285, com alteração em 8p23.2, na posição chr8:3006107-4232989, com fenótipo de autismo; e #250509, com alteração na banda 8p23.2, na posição chr8:3332235-3836835, com fenótipo de comportamento agressivo, autismo,

atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem, eversão do lábio inferior, sensação de dor prejudicada, deficiência intelectual e de atenção.

Acredita-se que o fenótipo apresentado pela paciente 12, incluindo dismorfias e alterações neurológicas e cardíacas, estão de acordo com as alterações genômicas detectadas pela técnica de aCGH, com exceção das anormalidades do trato urinário, que não foram correlacionadas com nenhum achado citogenômico.

A análise por aCGH da paciente 12, com material adicional na região cromossômica 8p visualizado por citogenética clássica, evidenciou várias áreas de ganho na região 8p, especificamente 8p11.22, 8p12, 8p22 e 8p23.2-p23.3, associadas ao fenótipo da paciente.

O paciente 13, portador de um cromossomo marcador adicional, com um fenótipo rico em malformações, apresentou oito alterações após avaliação por técnica de aCGH. Foram detectados seis ganhos: de 2Mb, na região 22q11.1-q11.21, envolvendo 25 genes: *CCT8L2*, *TPTEP1*, *ANKRD62P1-PARP4P3*, *XKR3*, *HSFY1P1*, *GAB4*, *CECR7*, *IL17RA*, *CECR6*, *CECR5*, *CECR5-AS1*, *CECR1*, *CECR3*, *CECR2*, *SLC25A18*, *ATP6V1E1*, *BCL2L13*, *BID*, *MIR3198-1*, *MICAL3*, *MIR648*, *FLJ41941*, *PEX26*, *TUBA8* e *USP18*; de 158kb, na região 8p11.22, envolvendo os genes *ADAM5* e *ADAM3A*; de 124kb, na região 11p11.2, envolvendo quatro genes *AMBRA1*, *HARB1*, *ATG13* e *ARHGAP1*; de 96kb, na região 12p13.31; de 76kb, na região 11q11, envolvendo os genes *OR4C11*, *OR4P4*, *OR4S2* e *OR4C6*, e de 74kb, na região Xp22.2, envolvendo o gene *ARHGAP6*. Foram registradas duas perdas: de 147kb, na região 7q31.1, envolvendo o gene *IMMP2L*; e de 143kb, em homozigose, na região 15q14, envolvendo quatro genes: *GOLGA8A*, *MIR1233-1*, *MIR1233-2* e *GOLGA8B*.

O fenótipo do paciente 13 abrange múltiplas malformações, criptorquidia à esquerda, escroto em cachecol, hipospádia peniana, macrocrania, dolicocefalia, fronte ampla, fenda palpebral oblíqua para baixo, orelhas baixo implantadas e rodadas posteriormente, apêndice pré-auricular à esquerda, microtia à direita, narinas antevertidas, micrognatia e clinodactilia de 5° quirodáctilo bilateral.

Pequenos cromossomos marcadores supranumerários estão presentes em cerca de 0,05% da população humana, sendo que aproximadamente 28% dos afetados apresentam um fenótipo anormal. A prevalência de nascimentos de portadores de cromossomos marcadores extranumerários é estimada em 0,14-0,72 a cada 1000 nascimentos. Deste número, cerca de 9% apresentam trissomia do cromossomo 22, que pode causar a Síndrome do Olho do Gato (CES), que engloba a região proximal do cromossomo 22q (Heinrich *et al.*, 2012). A maioria

dos casos de trissomia do cromossomo 22 ocorre por erros durante a ovogênese, predominantemente durante a primeira divisão meiótica (Belien *et al.*, 2008).

Na CES, ou síndrome de microduplicação 22q11.21, o fenótipo dos pacientes varia de leve a grave e os principais achados clínicos são: malformações craniofaciais, caracterizadas por microcefalia, coloboma ocular, microftalmia, hipertelorismo, alinhamento alto das sobrancelhas, fendas palpebrais inclinadas para baixo, hipoplasia de face média, ponte nasal ampla, fenda palatina e apêndices pré-auriculares, além de cardiopatia congênita, deficiência mental, anomalias esqueléticas, renais e genitais. Achados frequentes adicionais incluem artéria umbilical única e ânus anormal (Heinrich *et al.*, 2012).

A trissomia parcial do cromossomo 22, como resultado da duplicação intersticial 22q11.2, é suficiente para causar a CES clássica, com todas as características da síndrome. Pressupõe-se que um efeito de dosagem dos genes contidos na área duplicada, seja responsável pelo fenótipo dessa síndrome. A análise citogenética de um paciente com hipótese diagnóstica de síndrome do olho do gato deve sempre incluir uma avaliação cuidadosa das anomalias estruturais localizadas na parte proximal da região 22q (Meins *et al.*, 2003).

O banco de dados OMIM, descreve o gene *CECR* (#115470), associado à síndrome do olho do gato, na região 22q11.1-q11.23, posição chr22:14700001-25900000.

O Banco de dados DECIPHER descreve quatro casos com ganhos na região 22q11.1 em portadores de diversos fenótipos. São eles: #250990, na posição chr22:16895596-17613033, com fenótipo de autismo, atraso de desenvolvimento na fala e na linguagem, dedos afilados e obesidade; #262647, na posição chr22:17073066-17656831, com fenótipo de autismo, macrocefalia e alta estatura; #255654, na posição chr22:17096655-17455035, com fenótipo de prejuízo cognitivo, má rotação intestinal e apêndices pré-auriculares; #248986, na posição chr22:17279961-17309807, com fenótipo de deficiência intelectual, baixa estatura, microcefalia, anisocoria, fenda palatina, surdez neurossensorial e cabelos ralos.

Para validação do ganho na região 22q11.1 detectada no paciente 13, realizamos a FISH com sonda específica para esta região, cobrindo a posição chr22:17427487-18040145. O resultado por FISH comprovou a trissomia desta região, localizada no cromossomo marcador e o diagnóstico citogenético definitivo foi caracterizado como 47,XY,+mar.ish +22(q11.1)(G100550V+).

Um caso com alteração na banda 8p11.22, descrito no DECIPHER (#282314), na posição chr8:39237438-39380654, foi descrito com fenótipo de metacarpo, falanges e metatarso curtos.

O DECIPHER também descreve tres casos com alteração na região 7q31.1. São elas: #271315, posição chr7:111092450-111283978, com fenótipo de anomalia Duane; #262166, posição chr7:111097485-111158001, com fenótipo de deficiência intelectual e hipotonia muscular e #281194, posição chr7:111105151-111149166, com fenótipo de anormalidade comportamental/psiquiátrica, atraso no desenvolvimento global e microcefalia.

O paciente 13, com cariótipo evidenciando a presença de um cromossomo marcador adicional, apresentou em seu diagnóstico citogenômico uma trissomia parcial do cromossomo 22, que foi confirmado por técnica de FISH. Este resultado foi a principal alteração ligada ao fenótipo do paciente, caracterizado como portador da síndrome do olho de gato.

O projeto de pesquisa continua a ser desenvolvido em nosso laboratório, sendo incluídos pacientes com cariótipo normal para análise citogenômica (resultados não incluídos). Com uma capacidade quase quatro vezes maior de detecção de anormalidades cromossômicas que as técnicas convencionais, esperamos que a detecção de alterações citogenômicas forneça maiores evidências para correlação genótipo/fenótipo de pacientes portadores de anomalias congênitas.

Conclusões

7.0 - CONCLUSÕES

- A investigação citogenômica por meio da técnica de *array* CGH mostrou-se altamente eficiente para definição diagnóstica de pacientes portadores de anomalias congênicas e anormalidades cromossômicas;
- Os resultados obtidos pela técnica de *array* CGH possibilitaram a correlação entre cariótipo/fenótipo/genótipo em oito pacientes, correspondendo a 80% da amostra estudada;
- A investigação citogenômica não foi informativa para dois pacientes portadores de anomalias congênicas e cariótipo anormal, sendo um portador de cromossomo marcador de pequeno tamanho e o segundo portador de translocação aparentemente equilibrada;
- A associação das técnicas de citogenética clássica, citogenética molecular e citogenômica permitiu relacionar o ganho na região 8p23 (presente nos pacientes 4, 5 e 6) ao fenótipo de dislipidemia;
- A mesma associação possibilitou o diagnóstico preciso e a caracterização molecular das: (1) síndrome de Jacobsen, definindo o fenótipo característico da deleção da região 11q24.2-q25; (2) síndrome de Pallister-Killian por ganho da região 12p11.21-p13.31 e (3) síndrome do olho do gato por ganho da região 22q11.1;
- A técnica de *array* CGH mostrou-se efetiva para definição diagnóstica de pacientes que apresentaram cariótipo com material adicional (4/4 correspondente a 100% de eficácia), cromossomo em anel, deleção cromossômica e cromossomo marcador;
- A definição do diagnóstico etiológico possibilitou a definição de risco de recorrência e o aconselhamento genético para sete das nove famílias incluídas em no estudo.

Por fim, concluímos que a técnica de aCGH utilizando a plataforma 2x400k (Agilent,USA) foi uma ferramenta que possibilitou a varredura do genoma humano dos pacientes portadores de anomalias congênicas, elucidando os desequilíbrios cromossômicos, identificando e descrevendo perdas e ganhos genômicos relacionados ao fenótipo específico dos pacientes.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOITY, A. T. *et al.* 15q11.2 Proximal Imbalances Associated With a Diverse Array of Neuropsychiatric Disorders and Mild Dysmorphic Features. **J Dev Behav Pediatr**, v. 33, p. 570–576, 2012.

AL-ASHI, S. F. & SHARIF, F. A. Familial reciprocal translocation t(8;17)(p23;q21) in a woman with recurrent spontaneous abortion. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, v. 2, n. 4, p. 695-697, 2013. ISSN 2320-1770.

ALGAR, E. M. *et al.* Paternally Inherited Submicroscopic Duplication at 11p15.5 Implicates Insulin-like Growth Factor II in Overgrowth and Wilms' Tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 67, n. 5, 2007.

ARCOS-BURGOS, M. *et al.* Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a Population Isolate: Linkage to Loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. **Am. J. Hum. Genet**, v. 75, 2004.

ARTMAN, M. *et al.* **Cardiovascular Development and Congenital Malformations: Molecular & Genetic Mechanisms**. Nova Iorque: Blackwell Futura, 2005.

BAYANI, J.; SQUIRE, J.A. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). **Curr Protoc Cell Biol**. 2004.

BELIEN, V. *et al.* Partial Trisomy of Chromosome 22 Resulting From a Supernumerary Marker Chromosome 22 in a Child With Features of Cat Eye Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, p. 1871–1874, 2008.

BINT, S. M.; DAVIES, A. F.; OGILVIE, C. M. Multicolor banding remains an important adjunct to array CGH and conventional karyotypin. **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n. 33, 2013.

BISHOP, R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. **Bioscience Horizons**, v. 3, n. 1, p. 85-95, 2010.

BREMER, A. *et al.* Copy Number Variation Characteristics in Subpopulations of Patients With Autism Spectrum Disorders. **Am J Med Genet Part B**, v. 156, p. 115–124, 2011.

BURNSIDE, R. D. *et al.* Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. **Hum Genet**, v. 130, p. 517–528, 2011.

CALONE, A. *et al.* Malformações congênitas: aspectos maternos e perinatais. **Revista da AMRIGS**, v. 53, n.3, p. 226-230, 2009.

CAMPBELL, L. J. **Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols**. Nova Iorque: Springer Science, 2011.

CHUDоба, A. I. *et al.*. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**. 1999,84:156–160.

_____. mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. **Cytogenet Genome Res**, v. 104, 2004.

CLANCY, S.; SHAW, K. DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders. **Nature Education**, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-deletion-and-duplication-and-the-associated-331>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

COOPER, G. M. *et al.* A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. **Nat Genet**, v. 43, n. 9, p. 838–846, 2012.

CURTIS, C. *et al.* The pitfalls of platform comparison: DNA copy number array technologies assessed. **BMC Genomics**, v. 10, n. 588, 2009.

DECIPHER. **Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources**. Disponível em: <<http://decipher.sanger.ac.uk/>>. Acesso 20 mar. 2014.

DHILLON, R. K. *et al.* Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 1, 2014.

DIRSĖ, V. *et al.* Report of Jacobsen syndrome with a mild facial dysmorphism, severe hearing impairment and trombocytopenia. **Acta Medica Lituanica**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2012.

ESTIVILL, X. A. & LUÍS, L. Copy Number Variants and Common Disorders: Filling the Gaps and Exploring Complexity in Genome-Wide Association Studies. **Plos Genetics**, v. 3, n. 10, p. 1787-1799, 2007.

FERLINI, A. *et al.* Custom CGH array profiling of copy number variations (CNVs) on chromosome 6p21.32 (HLA locus) in patients with venous malformations associated with multiple sclerosis. **BMC Medical Genetics**, v. 11, 2010.

GAO, J. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, p. 33, 2012.

GARDNER, R.J. M.; Sutherland, G.R.; Shaffer, L.G. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 4^oed. New York: Oxford; 2012.

GENOME BROWSER. The human genome browser at UCSC. Disponível em: <<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

GOEL, H. & PHADKE, R. Reciprocal balanced translocation: infertility and recurrent spontaneous abortions in a family. **Andrologia**, v. 43, 2011.

GRESHAM, D.; DUNHAM, M. J.; BOTSTEIN, D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 291-302, 2008.

HANSSON, K. B. M. *et al.* Molecular and clinical characterization of patients with a ring chromosome 11. **European Journal of Medical Genetics**, v. 55, p. 708-714, 2012.

HEIJMANS, B. T. B., AARIAN. PUTTER, HEIN. SLAGBOOM, ELINE. Meta-analysis of four new genome scans for lipid parameters and analysis of positional candidates in positive linkage regions. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, p. 1143–1153, 2005.

HEINRICH, T. *et al.* Live-Born Trisomy 22: Patient Report and Review. **Mol Syndromol**, v. 3, p. 262–269, 2012.

HILLIER, L. W. *et al.* Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4. **Nature**, v. 434, 2005.

HILLMAN, S. C. *et al.* Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 37, p. 6–14, 2011.

HOROVITZ, D. D. G. *et al.* Birth defects in Brazil and health care: proposals for public policies in clinical genetics. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 12, 2006.

HOROVITZ, D. D. G.; LLERENA JR, J. C.; MATTOS, R. A. D. Birth defects and health strategies in Brazil: an overview. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 4, 2005.

HU *et al.* Application of Multicolor Banding for Identification of Complex Chromosome 18 Rearrangements. **Journal of Molecular Diagnostics**, Vol. 8, No. 4, 2006.

IOUROV, V. Y. *et al.* Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, n. 46, 2012.

ISCA. The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium. Disponível em: <<https://www.iscaconsortium.org/index.php>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

IZUMI, K. *et al.* Duplication 12p and Pallister-Killian syndrome: A Case Report and Review of the Literature Toward Defining a Pallister-Killian Syndrome Minimal Critical Region. **American Journal of Medical Genetics**, v. 9999, p. 1–13, 2012.

JARICK, I. *et al.* Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, 2011.

JONES, L.K. Smith Padrões Reconhecíveis de Malformações Congênicas. **6ª ed. São Paulo: Manole; 2007.**

KASHEVAROVA, A. *et al.* **1866 – Novel candidate genomic loci for mental retardation.** Abstracts of the 21th European Congress of Psychiatry. MASSON, E. European Psychiatry. 28 2013.

LEE JA, C. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. **Cell**, v. 131, n. 7, p. 1235–1247 2007.

LIEHR *et al.* Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. **Int J Mol Med**. 2002;9:335–339

LUQUETTI, D. V. & KOIFMAN, R. J. Quality of birth defect reporting in the Brazilian Information System on Live Births (SINASC): a comparative study of 2004 and 2007. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 9, p. 1756-1765, 2010.

_____. Surveillance of birth defects: Brazil and the US. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n. Supl.1, p. 1660, 2011. ISSN 1413-8123.

MAHJOUBI, F. *et al.* Trisomy 8p (p11.2-pter) due to maternal translocation t(8;13)(p11;p12) in a child with dysmorphic features. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 11, n. 2, 2005.

MALUF, S. W. R., MARILUCE. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. ISBN 8536325097, 9788536325095.

MARAFIE, M. J. *et al.* Partial Duplication of Chromosome 8p: Report of 5 Patients and Review of Literature. **Egypt. J. Hum. Genet**, v. 8, n. 2, 2007.

MARTELLI, L. **Citogenética clássica e molecular aplicada ao diagnóstico de aberrações cromossômicas**. 2010. 146f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina (FMRP), USP, Ribeirão Preto. 2010.

MEINS, M. *et al.* Partial trisomy of chromosome 22 resulting from an interstitial duplication of 22q11.2 in a child with typical cat eye syndrome. **Med Genet**, v. 40, n.62, p. 1-4, 2003.

MILLER,D.T.; ADAM, M.P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L.G.; BROTHMAN, A.R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D.M.; CROLLA, J.A.; EPSTEIN, E.E.,W.; FAUCETT, A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J.M.; HAMOSH, A.; ROSENBERG, C.;

SCHERER, S.W.; SPINNER, N.B.; LEDBETTER, D.H. Consensus Statement: Chromosomal Microarray is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **The American Journal of Human Genetics**. 2010.

MOSESSO, P. A. *et al.* In vitro cytogenetic assays: Chromosomal aberrations and micronucleus tests. **Methods in Molecular Biology**, v. 1044, 2013.

NALBANTOĞLU, B. *et al.* Jacobsen syndrome without thrombocytopenia: a case report and review of the literature. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 55, p. 203-205, 2013.

NAOUMOVA, R. P. *et al.* Confirmed Locus on Chromosome 11p and Candidate Loci on 6q and 8p for the Triglyceride and Cholesterol Traits of Combined Hyperlipidemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, 2003.

NATARAJAN, A. & BOEI, J. J. W. A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research**, v. 544, 2003.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G.; HAYASHI, M. Editorial: Chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 657, 2008.

O'CONNOR, C. Chromosome Mapping: Idiograms. **Nature Education**, n. 1, 2008.

OBE, G. *et al.* Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, 2002.

OLIVEIRA, C. I. F. *et al.* Birth defects in newborns and stillborns: an example of the Brazilian reality. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 343, 2011. ISSN 1756-0500.

OMIM. **Online Mendelian Inheritance in Man**: An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Disponível em: <<http://omim.org/>>. Acesso em: 20 Mar. 2014.

PARK, C. *et al.* A Multi-Sample Based Method for Identifying Common CNVs in Normal Human Genomic Structure Using High-Resolution aCGH Data. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

PARK, S.J. *et al.* Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. **Molecular Cytogenetics**, v. 4, n. 12, 2011.

PAGON, R.A *et al.* **GeneReviews Database**. NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>>. Acesso: 20 mar. 2014.

PEREIRA-MARTINS, S.R. Estudo citogenético molecular de casais com abortamentos de repetição. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo: 2000.**

PEREIRA, T. M. *et al.* Frequency of chromosomal abnormalities: the significance for cytogenetic diagnosis. **Arq Ciênc Saúde**, v. 16, n. 1, p. 31-33, 2009.

PINTO JR, W. Prenatal diagnosis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 139-157, 2002.

PRAKASH, K. R. **Copy number variations as potential biomarkers for disease development in breast cancer**. 2011. 27f. Dissertação (Mestrado). Department of Microbiology Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

RANKINEN, T. *et al.* The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. **Obesity**, v.14, n. 4, p. 529-644, 2006.

REFSEQ. **Reference Sequence**. NCBI, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

SCAMBLER, P. J. The 22q11 deletion syndromes. **Human Molecular Genetics.**, v. 9, n. 16, p. 2421–2426, 2000.

SELLER *et al.* Multicolor Banding Detects a Complex Three Chromosome, Seven Breakpoint Unbalanced Rearrangement in an ICSI-Derived Fetus With Multiple Abnormalities. **American Journal of Medical Genetics: Part A**, 2006.

SHAFFER, L. G.; TOMMERUP, N.; KARGER, B. **ISCN (2013): An Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Cytogeneticc and Genome Research., 2013.

SHETH, F. *et al.* Evolution of Cytogenetics in Disease Diagnosis. **J. Transl. Toxicol.**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2014.

SHOULDERS, C. C.; JONES, E. L.; NAOUMOVA, R. P. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. **Human Molecular Genetics**, v. 13, 2004.

SILVA, A. E. *et al.* Couples with recurrent miscarriages: contributions of chromosome translocations. **Arq Ciênc Saúde**, v. 14, n. 4, p. 211-215, 2007.

SMITH, A. C. *et al.* Growth Regulation, Imprinted Genes, and Chromosome 11p15.5. **Pediatric Research**, v. 61, n. 5, 2007.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. **Annu. Rev. Med**, p. 437-455, 2010.

THEISEN, A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). **Nature Education**, 2008.

THOMPSON., T. A. **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

UYSAI, A. *et al.* Double translocation: an interesting family history. **BJMG**, v. 16, n. 1, p. 77-80, 2013.

VALDES-MIRANDA, J. M. *et al.* A novel microdeletion involving the 13q31.3–q32.1 region in a patient with normal intelligence. **European Journal of Medical Genetics.**, v. 57, p. 60-64, 2014.

VENEGAS-VEGA, C. A. *et al.* Diagnosis of Familial Wolf-Hirschhorn Syndrome due to a Paternal Cryptic Chromosomal Rearrangement by Conventional and Molecular Cytogenetic Techniques. **BioMed Research International**, 2013.

WEISE, A. *et al.* Microdeletion and Microduplication Syndromes. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 346–358, 2012.

WIKIPREMED. **The human karyotype.** 297500_KARYOTYPE_68. The WikiPremed MCAT Course. 2014.

Anexos

ANEXO I

- **Caso 1- Família A** (Pacientes 1, 2 e 3)

Paciente 1 – DBSS

Nascimento: 21/11/1997

Sexo: Masculino

Cariótipo: 5208

Paciente 2 – FFSS (mãe de DBSS)

Nascimento: 07/05/1963

Sexo: Feminino

Cariótipo: 5208M

Paciente 3 – ABS (pai de DBSS)

Nascimento: 13/11/1973

Sexo: Masculino

Cariótipo: 5208P

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 1, sexo masculino, 16 anos de idade. Encaminhado ao setor de Genética Médica aos 8 anos e 9 meses de idade por possuir fenótipo de obesidade e deficiência intelectual, além de dismorfias: pit pré-auricular à direita, braquicefalia, hipertelorismo, fenda palpebral oblíqua para baixo, ponte nasal alargada, orelhas grandes, baqueteamento digital, e alta estatura fora do canal familiar. Teste do Pezinho sem alterações. Submeteu-se a orquidopexia bilateral aos 3 meses de idade e amigdalectomia aos 4 anos.

História Familiar:

A Paciente 2, possui histórico de 4 gestações: 2 partos e 2 abortos. Os Pacientes 2 e 3 são consanguíneos, primos em 2º grau, e apresentam cariótipos com alterações citogenéticas.

Cariótipo

Cariótipo por bandamento GTG do Paciente 1, e dos seus genitores:

Cariótipo do Paciente 1: 46,XY,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2

Cariótipo da Paciente 2 (mãe): 46,XX, der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2

Cariótipo do Paciente 3 (pai): 46,XY,inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)

HEREDOGRAMA

Legenda:

- Portador de inversão do cromossomo 12: 46,XY,inv(12)

- Portadora de inversão do cromossomo 12: 46,XX,inv(12) (p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2

- Aborto

- Afetado

- Falecido

- **Caso 2- Família B** (Pacientes 4, 5, e 6)

Paciente 4 – MES

Nascimento: 19/01/2003

Sexo: Feminino

Cariótipo: 4108

Paciente 5 – HOS

Nascimento: 30/01/2003

Sexo: Masculino

Cariótipo: 3818

Paciente 6 – CAS (pai de MES e HOS)

Nascimento: 07/02/1971

Sexo: Masculino

Cariótipo: 4108P

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 4, sexo feminino, 11 anos de idade, iniciou acompanhamento pelo setor de Genética Médica por apresentar microcefalia e apresentar convulsões. Possui hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, valores alterados de cobre sérico, e proteinúria. O Paciente 5, sexo masculino, 11 anos de idade, meio-irmão paterno da Paciente 4, foi encaminhado ao setor de Genética Médica por apresentar hipotonia ao nascimento, deficiência de crescimento, convulsões e valor aumentado de cobre sérico. Entretanto, não apresentou dislipidemias ou proteinúria. O Paciente 6, sexo masculino, 43 anos, genitor dos Pacientes 4 e 5, possui hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

História Familiar:

Os cariótipos das mães dos Pacientes 4 e 5 são normais, assim como os dos pais do Paciente 6 (avós paternos das crianças). Os pais dos Pacientes 4 e 5 não são consanguíneos. O Paciente 6 possui outra filha, com a mesma translocação e cariótipo, 46,XY, t(4;8)(p16,p23.1), com hiperlipidemia confirmada, mas sem outros achados fenotípicos.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, dos meio-irmãos paternos e do genitor:

Cariótipo da Paciente 4: 46,XX, der(4)t(4;8)(p16;p23.1)pat

Cariótipo do Paciente 5: 46,XY, der(4)t(4;8)(p16;p23.1)

Cariótipo do Paciente 6.: 46,XY, t(4;8)(p16;p23.1)

HEREDOGRAMA

- **Caso 3 – Paciente 7**

Paciente 7 – THAO

Nascimento: 11/03/2002

Sexo: Masculino

Cariótipo: 7389

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 7, sexo masculino, 12 anos de idade, encaminhado ao setor de Genética Médica por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, desde o período de lactação, evoluindo para hiperatividade, movimentos involuntários e alteração de comportamento. Não alfabetizado. Desenvolveu obesidade aos 10 anos, com hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial. Possui dismorfias como

microcefalia, estreitamento frontal, achatamento occipital, nariz curto com narinas antevertidas, boca pequena e em carpa, orelhas não displásicas, prega palmar única, pescoço curto, baixa implantação de cabelos. Ausculta cardíaca com sopro sistólico ++/6+, clinodactilia de 5º quirodáctilo, pré púbere, pênis curvo com chordee e testículos tópicos.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, do Paciente 7:

Cariótipo do Paciente 7.:45,XY,-11[18]/46,XY,r(11)[78]/46,XY,dicr(11;11)[4]

- **Caso 4 – Paciente 8**

Paciente 8 – VSJ

Nascimento: 21/01/1997

Sexo: Masculino

Cariótipo: 6874

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 8, sexo masculino, 17 anos de idade, foi encaminhado ao setor de Genética Médica por apresentar atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (hiperatividade, déficit de atenção, imaturidade e isolamento social), com extrema dependência dos pais. Perímetro cefálico de 52cm, palato em ogiva, testículos equitópicos em canal inguinal. Nasceu prematuro, de 32 semanas.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo por bandamento GTG do paciente 8:

Cariótipo do paciente 8: 46,XY,add(12)(p13)

- **Caso 5 – Paciente 9**

Paciente 9 – NLM

Nascimento: 25/04/1989

Sexo: Feminino

Cariótipo: 2726

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 9, sexo feminino, 25 anos de idade, nascida de parto cesárea, com hipóxia ao nascimento. Encaminhada ao setor de Genética Médica por apresentar atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, baixa estatura, microcefalia, dismorfias faciais, lábio inferior fino, frouxidão ligamentar, cardiopatia e cifoescoliose importante. Iniciou quadro de prolapso mucoso retal aos 23 anos de idade.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, da paciente:

Cariótipo da paciente 9: 47,XX+mar

- **Caso 6 – Paciente 10**

Paciente 10 – SPS

Nascimento: 12/06/2010

Sexo: Masculino

Cariótipo: 6639

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 10, sexo masculino, 3 anos e 10 meses de idade. Malformação fetal do paciente detectada inicialmente por ultrassom obstétrico. Nasceu a pré-termo limítrofe, apresentando irregularidades no padrão respiratório. Apresenta macrocefalia, fontanela ampla, abaulamento occipital, ausência de 1º quirodáctilo, 1º pododáctilo adulto e pés equinovaros. Apresentou crises convulsivas (encefalopatia difusa/epilepsia focal), e possui acentuada hidrocefalia com redução volumétrica cerebral, pequena lesão parietal à esquerda, holoprosencefalia semilobar, agenesia de corpo caloso, sinais de cranioestenose das suturas sagitais com braquicefalia. Apresenta genitália ambígua com genitália externa com hipertrofia de grandes e pequenos lábios e do tubérculo genital, mas não foram detectados útero ou ovários. Apresenta perda auditiva bilateral profunda e coloboma em ambos os olhos.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, do paciente:

Cariótipo do Paciente 10: 46,XY,del(13)(q31)

- **Caso 7 – Paciente 11**

Paciente 11 – DGF

Nascimento: 28/12/2003

Sexo: Masculino

Cariótipo: 4260

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 11, sexo masculino, 10 anos de idade, encaminhado ao setor de Genética Médica por apresentar genitália ambígua, caracterizada por criptorquidia bilateral, com testículo esquerdo palpável no canal inguinal, e hipospádia peno-escrotal, com bolsa escrotal hipoplásica, hiperpigmentada e enrugada. Possui bom desenvolvimento neuropsicomotor, e ausência de distúrbios significativos.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, do paciente:

Cariótipo do Paciente 11: 46,XY,t(1;11)(q31;p13)

- **Caso 8 – Paciente 12**

Paciente 12 – BVNS

Nascimento: 13/02/2007

Sexo: Feminino

Cariótipo: 5305

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 12, sexo feminino, 7 anos de idade, apresentou alterações morfológicas fetais observadas por ultrassom obstétrico (agenesia de corpo caloso, ventriculomegalia, artéria umbilical única e obstrução de junção ureteropielica). Evoluiu com corioamniorrexe prematura e bradicardia fetal. Ao nascimento, apresentou encurtamento de 5º quirodáctilos bilateral e crânio turricefálico.

Apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, com agenesia de corpo caloso, hipoplasia de vermis cerebelar e do hemisfério cerebelar esquerdo (variante Dandy Walker). Apresenta dismorfias, como: macrocefalia, apagamento supraorbitário, frontal baixo com hipertricrose, nariz pequeno, narinas antevertidas, boca pequena, cutis marmorata e fenda palpebral oblíqua para cima. Paciente apresenta déficit funcional do rim esquerdo de grau discreto, associado à acentuada hidronefrose, com obstrução urinária.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, da paciente:

Cariótipo da paciente 12: 46,XX,add8p,inv(9)p13q13

• Caso 9 – Paciente 13

Paciente 13 – GBG

Nascimento: 09/03/2011

Sexo: Masculino

Cariótipo: 6975

Avaliação Clínica Resumida:

Paciente 13, sexo masculino, 3 anos de idade, encaminhado ao setor de Genética Médica por apresentar múltiplas malformações. Macrocrania fetal observada durante ultrassom obstétrico. Ao nascimento, foi observado ânus imperfurado e má rotação intestinal, além da ausência de movimento laringotraqueal para alimentos de consistência pastosa e líquida. Apresenta genitália tipicamente masculina, com criptorquidia à esquerda, escroto em cachecol e hipospádia peniana. Apresenta macrocrania, dolicocefalia, fronte ampla, fenda palpebral oblíqua para baixo, orelhas baixo implantadas e rodadas posteriormente, apêndice

pré-auricular à esquerda, microtia à direita, narinas antevertidas, micrognatia e clinodactilia de 5º quirodáctilo bilateral.

História Familiar:

Pais não consanguíneos, sem alterações fenotípicas e com resultado do exame de cariótipo normal.

Cariótipo

Cariótipo, por bandamento GTG, do paciente:

Cariótipo do Paciente 13: 47,XY, + mar